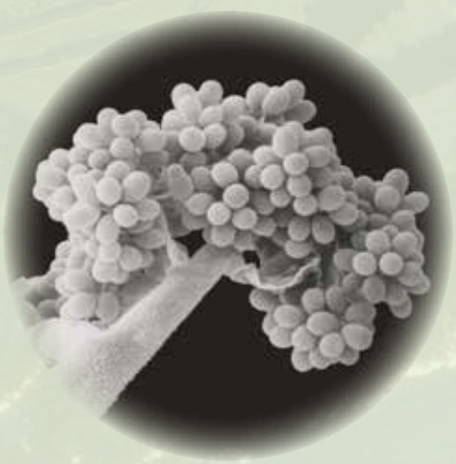
Colección Nuevo Conocimiento Agropecuario

Control biológico
de fitopatógenos, insectos y ácaros

Volumen 2. Aplicaciones y perspectivas

Alba Marina Cotes
Editora



AGROSAVIA
Corporación colombiana de investigación agropecuaria

Alba Marina Cotes

Alba Marina Cotes es doctora en ciencias agronómicas de la Universidad de Lieja, en Bélgica (Gembloux Agrobiotec), tiene dos maestrías, una en biotecnología agrícola de esta misma universidad y otra en microbiología de la Universidad de los Andes de Colombia, y es licenciada en biología y química de la Universidad Libre. Es investigadora emérita de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), donde se ha desempeñado como líder del Grupo de Control Biológico de Plagas Agrícolas, directora de laboratorio y directora de centro de investigación. Sus áreas de acción profesional se enfocan en el control biológico, el desarrollo de bioplaguicidas, el manejo integrado de plagas y la biodiversidad microbiana. Luego de 24 años de trabajo en esta institución dedicará sus esfuerzos futuros a la consultoría en estos temas.

Continúa en la solapa siguiente...

Colección Nuevo Conocimiento Agropecuario

Control biológico
de fitopatógenos, insectos y ácaros

Alba Marina Cotes
Editora

AGROSAVIA
EDITORIAL

Mosquera, Colombia 2018

Volumen 2

Aplicaciones y perspectivas

AGROSAVIA
EDITORIAL

Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros / Alba Marina Cotes (Editora) -- Mosquera, (Colombia) : AGROSAVIA, 2018.

2 v. (Volumen 2: Aplicaciones y perspectivas - 512 páginas) (Colección Nuevo Conocimiento Agropecuario)
Incluye referencias bibliográficas, ilustraciones y datos numéricos
ISBN Obra completa(e): 978-958-740-252-0
ISBN Volumen 2(e): 978-958-740-254-4

1. Control biológico 2. Métodos de control 3. Bioplaguicidas 4. Epidemiología 5. Adaptación al cambio climático I. Cotes, Alba Marina (Editora).

Palabras clave normalizadas según Tesauro Multilingüe de Agricultura Agrovoc
Catalogación en la publicación – Biblioteca Agropecuaria de Colombia

Centro de Investigación Tibaitatá. Kilómetro 14 vía Mosquera-Bogotá. Código postal 250047, Colombia

Centro de Investigación Palmira. Diagonal a la intersección de la carrera 36A con calle 23 Palmira, Valle del Cauca. Código postal 763533, Colombia

Centro de Investigación La Libertad. Kilómetro 91, vía Puerto López-Puerto Gaitán, Meta. Código postal 502007, Colombia

Centro de Investigación Caribia. 65 km al sur de la capital de Santa Marta, Sevilla, Zona Bananera, Magdalena. Código postal 478020, Colombia

Centro de Investigación El Mira. Kilómetro 38, vía Tumaco-Pasto, Nariño. Código postal 528501, Colombia

Colección: Nuevo Conocimiento Agropecuario

Fecha de recepción: 07 de noviembre de 2017

Fecha de evaluación: 27 de noviembre de 2017

Fecha de aceptación: 23 de abril de 2018

Publicado octubre de 2018

Preparación editorial

Editorial AGROSAVIA

editorial@agrosavia.co

Editora científica: Alba Marina Cotes

Editora de contenidos: Liliana Gaona García

Asistentes editoriales: Víctor Camilo Pulido Blanco y Christian David Vargas Baquero

Corrección de estilo: Luz Ángela Uscátegui Cuellar, Jorge Enrique Beltrán Vargas, Edwin Daniel Algarra Suárez y Luisa Fernanda Espina Rodríguez

Realización gráfica: María Cristina Rueda Traslaviña, Wilson Martínez Montoya y Claudia Patricia Castiblanco

Impresión: Fundación Cultural Javeriana de Artes Gráficas (JAVEGRAF)

Citación sugerida: Cotes A. M. (Ed.). (2018). *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros* (Vol. 2). Mosquera, Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA).

Cláusula de responsabilidad: AGROSAVIA no es responsable de las opiniones e información recogidas en el presente texto. Los autores asumen de manera exclusiva y plena toda responsabilidad sobre su contenido, ya sea este propio o de terceros, declarando en este último supuesto que cuentan con la debida autorización de terceros para su publicación; igualmente, declaran que no existe conflicto de interés alguno en relación con los resultados de la investigación propiedad de tales terceros. En consecuencia, los autores serán responsables civil, administrativa o penalmente, frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros relativa a los derechos de autor u otros derechos que se hubieran vulnerado como resultado de su contribución.

Nota aclaratoria: A partir de mayo de 2018, la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria cambió su acrónimo Corpoica por AGROSAVIA

Línea de atención al cliente: 018000121515

atencionalcliente@agrosavia.co

www.agrosavia.co

https://co.creativecommons.org/?page_id=13

Tabla de contenido

Los autores 25
Agradecimientos 33
Prólogo 35
Prefacio 36

Volumen 1
Agentes de control biológico

Introducción
El concepto de control biológico y sus premisas fundamentales
The concept of biological control and its fundamental premises 40

Sección I
Control biológico de enfermedades vegetales

Capítulo 1
Control biológico de patógenos foliares
Biological control of foliar pathogens 58

Capítulo 2
Control biológico de fitopatógenos del suelo
Biological control of soil-borne phytopathogens 144

Capítulo 3
Control biológico de patógenos en poscosecha
Biological control of postharvest pathogens 222

Capítulo 4
Estudios del microbioma y su aplicación en el control biológico de fitopatógenos
Microbiome studies in the biological control of plant pathogens 256

Sección II

Control biológico de insectos plagas

Capítulo 5

Bacterias entomopatógenas en el control biológico de insectos

Entomopathogenic bacteria in insect biological control 296

Capítulo 6

Hongos entomopatógenos en el control biológico de insectos plaga

Entomopathogenic fungi in insect pests biological controls 334

Capítulo 7

Virus entomopatógenos en el control biológico de insectos

Entomopathogenic viruses in the biological control of insects 368

Capítulo 8

Las feromonas en el control de insectos

Pheromones in insect control 410

Capítulo 9

Uso de depredadores como agentes de control biológico para insectos plaga

Use of predators as biological control agents of insect pests 454

Capítulo 10

Uso de parasitoides en el control biológico de insectos plaga en Colombia

Use of parasitoids in insect biological control in Colombia 486

Índice temático 544

Volumen 2

Aplicaciones y perspectivas

Sección III

Implementación del control biológico

Capítulo 11

Diseño conceptual, selección y prueba de concepto de microorganismos biocontroladores

Conceptual design, selection and proof of concept of biological control microorganisms 594

Capítulo 12

Desarrollo y escalamiento de bioplaguicidas

Development and scaling of biopesticides 628

Capítulo 13

Marco regulatorio para el registro de bioplaguicidas

Regulatory framework for the registration of biopesticides 692

Capítulo 14

Investigación, desarrollo y registro de enemigos naturales para control biológico. Caso: *Phytoseiulus persimilis*

Research, development and registry of natural enemies for biological control. Case: Phytoseiulus persimilis 716

Capítulo 15

Investigación, desarrollo y escalamiento de feromonas de insectos

Research, development and scaling of insect pheromones 742

Capítulo 16

Comercialización de agentes de control biológico

Commercialization of biological control agents 762

Capítulo 17

El control biológico en un contexto de manejo integrado de enfermedades

Biological control in the context of integrated plant diseases management 794

Capítulo 18

El control biológico en el contexto de un manejo integrado estratégico de insectos plaga

Biological control in the context of strategic integrated insect pest management 822

Sección IV

El futuro del control biológico

Capítulo 19

Los hongos endófitos en el control biológico de fitopatógenos e insectos plaga

Endophytic fungi in biological control of phytopathogens and insect pests 850

Capítulo 20

Nuevas estrategias para el control biológico de fitopatógenos

Novel strategies for plant pathogens biological control 878

Capítulo 21

Nuevas estrategias para el control biológico de insectos

Novel strategies for insect biological control 922

Capítulo 22

Las ómicas en el control biológico

Omics in biological control 950

Capítulo 23

Los volátiles microbianos y su potencial en el control biológico de fitopatógenos e insectos

Microbial volatiles and their potential in the biological control of plant pathogens and insects 988

Capítulo 24

Cambio climático, epidemiología vegetal y control biológico de fitopatógenos

Climate change, plant epidemiology and biological control of plant pathogens 1014

Capítulo 25

Cambio climático y control biológico de insectos: visión y perspectiva de la situación

Climate change and biological control of insects: current situation and perspectives 1034

Índice temático 1056

Lista de figuras

Volumen I

Figura 1. Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros 38

Introducción

El concepto de control biológico y sus premisas fundamentales

Figura 1. Uso exagerado e indiscriminado de plaguicidas químicos 46
Figura 2. Diferentes formas de control biológico 48

Sección I

Control biológico de enfermedades vegetales

Capítulo 1

Control biológico de patógenos foliares

Figura 1.1. Moho gris producido por *B. cinerea* en uvas 63
Figura 1.2. Conidióforo de *B. cinerea* 64
Figura 1.3. Mangos afectados en campo por *Colletotrichum gloeosporioides* 65
Figura 1.4. Antracnosis del tomate de árbol (*Solanum betaceum*) producido por *C. gloeosporioides* 66
Figura 1.5. Mildeo polvoso del pepino producido por *Podosphaera xanthii* 67
Figura 1.6. Aspecto microscópico del Mildeo polvoso del pepino 67
Figura 1.7. Mildeo polvoso de la mora, expresado como encrespamiento de hojas y desarrollo del patógeno en el envés, producido por *Sphaerotheca macularis* 68
Figura 1.8. Aspecto macro y microscópico de varias especies de *Trichoderma* aisladas de suelo colombiano 80
Figura 1.9. Aspecto macro y microscópico de varias cepas de levaduras aisladas de la filósfera de mora 83
Figura 1.10. Virus del mosaico del pepino (CMV) 87

Figura 1.11. Virus del mosaico del tabaco (TMV) 88
Figura 1.12. Síntomas típicos del virus de la vena ancha de la lechuga 89
Figura 1.13. Conidios del mildeo polvoso colapasados por una levadura 96
Figura 1.14. Adhesión de conidios de *Trichoderma harzianum* T39 sobre hifa de *Botrytis cinerea* 97
Figura 1.15. Modos de acción utilizados por *T. harzianum* T39 en el control de patógenos foliares 102
Figura 1.16. Resistencia sistémica inducida contra *Botrytis* sp. en el dosel 103
Figura 1.17. Moho gris producido por *B. cinerea* en mora 107
Figura 1.18. Efecto promotor de crecimiento del biofungicida Tricotec® en vitroplántulas de mora durante su endurecimiento (35 días) 108
Figura 1.19. Caracterización ecofisiológica de las levaduras 109
Figura 1.20. Prototipo de bioplaguicida a base de *R. glutinis* Lv316 111

Capítulo 2

Control biológico de fitopatógenos del suelo

Figura 2.1. Rizosfera de dos solanáceas 153
Figura 2.2. Colonización de rizobacterias 157
Figura 2.3. Efecto de la población microbiana sobre la salud de la planta 158
Figura 2.4. Principales grupos de microorganismos antagonistas aislados de la rizosfera que son el principio activo de la mayoría de los bioproductos registrados para el control de enfermedades 159
Figura 2.5. Micoparasitismo y antibiosis 160
Figura 2.6. Modos de acción utilizados por agentes de control biológico contra fitopatógenos del suelo 161
Figura 2.7. Estructuras químicas de compuestos representativos y diversidad de compuestos homólogos de las tres principales familias de lipopéptidos cíclicos sintetizados por *Bacillus subtilis* y *B. amyloliquefaciens* 166
Figura 2.8. Efecto de la mezcla de compuestos homólogos de fengicinas (Fng), iturinas (Itu) y surfactinas (Srf) sobre el desarrollo de *F. oxysporum* Map5, 24 h después de incubación (oscuridad, 30 °C, 125 rpm) 167
Figura 2.9. Efecto biocontrolador de *B. amyloliquefaciens* contra *F. oxysporum* en uchuva, expresado como competencia y producción de lipopéptidos 170
Figura 2.10. Micoparasitismo de *Trichoderma* spp. en la comunidad del suelo 172
Figura 2.11. Descripción de los modos de acción utilizados por *P. fluorescens* y especies de *Pseudomonas fluorescentes* estrechamente relacionadas con la protección de plantas 177
Figura 2.12. Síntomas y signos de la enfermedad conocida como rizoctoniasis de la papa causada por *R. solani* 185

Figura 2.13. Efecto biocontrolador de *Trichoderma* spp. sobre *R. solani* en tubérculos de papa 187

Figura 2.14. Curvas de progreso de la incidencia de la enfermedad del moho blanco de la lechuga en cultivos comerciales del municipio de Madrid, Cundinamarca 192

Figura 2.15. *S. sclerotiorum* y *S. minor* como patógenos de lechuga y soya 194

Figura 2.16. *Fusarium oxysporum* como patógeno de solanáceas 196

Figura 2.17. Efecto promotor de crecimiento vegetal por *T. koningiopsis* Th003 en tomate 198

Figura 2.18. Modos de acción de *Trichoderma koningiopsis* Th003 definidos para la interacción fríjol-*Pythium splendens* 199

Figura 2.19. Patógenos objetivos para los cuales se encuentra registrado Tricotec® hasta marzo de 2018 201

Capítulo 3

Control biológico de patógenos en poscosecha

Figura 3.1. Efecto de diversos patógenos sobre frutas y ornamentales en poscosecha 227

Figura 3.2. Aspecto microscópico (izquierda) y macroscópico (derecha) de levaduras utilizadas como agentes de control en poscosecha, correspondientes a los géneros: a. *Pichia*; b. *Rhodotorula*; c. *Candida* 235

Figura 3.3. Actividad biocontroladora de levaduras 236

Figura 3.4. Modos de acción atribuidos a biocontroladores de patógenos en poscosecha 237

Figura 3.5. Aspecto microscópico de la interacción entre la levadura *Rhodotorula glutinis* y *B. cinerea* en pétalos de rosa luego de 24 y 96 horas, respectivamente 239

Figura 3.6. Interacciones entre Patógeno–Fruta–Biocontrolador 242

Capítulo 4

Estudios del microbioma y su aplicación en el control biológico de fitopatógenos

Figura 4.1. Interacciones del fitobioma con los factores fisicoquímicos del entorno 269

Figura 4.2. Estudios de caso de microbiomas como herramienta para el diseño de nuevas estrategias de biocontrol 272

Figura 4.3. Vegetales y humanos: microbiomas compartidos 275

Figura 4.4. Síntomas de marchitamiento en plantas de tomate, 14 días después de ser infectadas con el patógeno 280

Figura 4.5. CLSM de la raíz de la planta del tomate infectada con *Ralstonia solanacearum* 281

Sección II

Control biológico de insectos plagas

Capítulo 5

Bacterias entomopatógenas en el control biológico de insectos

Figura 5.1. Modo de acción de las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensiss* 303
Figura 5.2. Microfotografía electrónica de transmisión de un esporangio de *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki 304
Figura 5.3. Ciclo de *Bacillus thuringiensis* 304
Figura 5.4. Microfotografía de contraste de fases de esporangios maduros concatenados de *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki 305
Figura 5.5. Larva de primer instar del gusano de cuerno del tabaco, *Manduca sexta*, atacado por las toxinas de *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki HD-1 305
Figura 5.6. Relación filogenética entre cepas tipo de *Bacillus thuringiensis*, obtenida a partir de las secuencias del gen *flaA* 312
Figura 5.7. Patrón de plásmidos de cepas tipo de *Bacillus thuringiensis* 313
Figura 5.8. Enfermedad láctea en larvas del escarabajo, *Popillia japonica*, causada por *Paenibacillus popilliae* 314
Figura 5.9. Micrografía de microscopía electrónica de transmisión de *Lysinibacillus sphaericus* 315
Figura 5.10. Vista macroscópica de colonias de *Serratia marcescens*, mostrando su típico pigmento de prodigiosina 316
Figura 5.11. Larvas del escarabajo *Costelytra givenii* 317

Capítulo 6

Hongos entomopatógenos en el control biológico de insectos plaga

Figura 6.1. Facsímil de la portada del libro *Mémoires pour servir à l'histoire des insectes* 338
Figura 6.2. Reproducción de una lámina de la obra de José Torrubia, *Aparato para la historia natural española*, publicada en 1754 339
Figura 6.3. Facsímil de la carátula del libro *Del mal del segno, calcinaccio o moscardino, malattia che affligge i bachide seta* 340
Figura 6.4. Esquema del proceso de infección de un hongo entomopatógeno 342
Figura 6.5. Infecciones características de hongos entomopatógenos 344
Figura 6.6. Control biológico de la broca del café 346
Figura 6.7. Bioplaguicida Lecabiol® para el manejo de poblaciones de *B. tabaci* y *T. vaporariorum* 349

Capítulo 7

Virus entomopatógenos en el control biológico de insectos

Figura 7.1. Extracto de Vida (1527), De Bombyce, libre ii 372

Figura 7.2. Micrografías y representación esquemática de la morfología de los cuerpos de inclusión de los géneros de la familia Baculoviridae: a. Cuerpos de inclusión de nucleopoliedrovirus; b. Cuerpos de inclusión de granulovirus 378
Figura 7.3. Ciclo de infección de los baculovirus 379
Figura 7.4. Larvas muertas por infección con baculovirus en campo 380
Figura 7.5. Daño causado, larvas sanas y larvas con infección viral de *T. solanivora*, *S. frugiperda* y *T. absoluta* 384

Capítulo 8

Las feromonas en el control de insectos

Figura 8.1. Línea de tiempo del desarrollo y uso de las feromonas 416
Figura 8.2. Esquema del sistema olfativo de los insectos 419
Figura 8.3. Esquema que explica la interrupción de cópula mediante el uso de feromonas 422
Figura 8.4. Trampas para la captura masiva de *R. palmarum* 432
Figura 8.5. Trampas de agua con feromonas (tapón naranja) para la captura masiva de *Tuta absoluta* 433
Figura 8.6. Experimentos de interrupción de cópula de *Tecia solanivora* en papa llevados a cabo por AGROSAVIA 439

Capítulo 9

Uso de depredadores como agentes de control biológico para insectos plaga

Figura 9.1. Control biológico 459
Figura 9.2. Coccinélidos en cultivos de cítricos 462
Figura 9.3. *A. punica*, depredador principal de *C. multicicatrices* 467
Figura 9.4. Control biológico en condiciones de invernadero 472

Capítulo 10

Uso de parasitoides en el control biológico de insectos plaga en Colombia

Figura 10.1. Microhimenópteros parasitarios de huevos de *Erinnyis ello* 508
Figura 10.2. Adultos de *Compsus viridivittatus* 509
Figura 10.3. *Fidiobia* sp. (Hymenoptera: Platygastridae) 511
Figura 10.4. Adultos de moscas taquínidas parasitoides de larvas de *Diatraea saccharalis* 513
Figura 10.5. Adulto de la mosca taquinida nativa *Genea jaynesi* (Rondani) 514
Figura 10.6. *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) 517
Figura 10.7. Adulto de *Tamarixia radiata*, detectando ninfas de *Diaphorina citri* 518
Figura 10.8. Adulto del parasitoide de la broca, *Cephalonomia stephanoderis* 521
Figura 10.9. Larva de II instar de *Hypothenemus hampei*, parasitada por una larva del ectoparasitoide, *Prorops nasuta* 522

Figura 10.10. Brocas perforando fruto de café 523

Figura 10.11. Adulto de *Phymastichus coffea*, parasitando una broca del café, al momento de penetrar en un fruto 524

Figura 10.12. Larva de *Phymastichus coffea* dentro del tórax de un adulto de la broca 525

Figura 10.13. Bandejas con café pergamino seco de agua, utilizado para la cría masiva de broca del café y de sus parasitoides 526

Volumen II

Sección III

Implementación del control biológico

Capítulo 11

Diseño conceptual, selección y prueba de concepto de microorganismos biocontroladores

Figura 11.1. Fases para el desarrollo de un bioplaguicida microbiano 599

Figura 11.2. Ejemplo de bioensayo para seleccionar biocontroladores de patógenos del suelo 604

Figura 11.3. Ejemplo de bioensayo para seleccionar biocontroladores de patógenos foliares 605

Figura 11.4. Ejemplo de bioensayo para seleccionar biocontroladores de patógenos en poscosecha 605

Figura 11.5. Ejemplo de bioensayo para seleccionar hongos entomopatógenos para el control de insectos plaga 606

Figura 11.6. Ejemplo de bioensayo para seleccionar virus entomopatógenos para el control de insectos plaga 607

Figura 11.7. Del aislamiento a la selección de biocontroladores con potencial para el desarrollo de bioplaguicidas 610

Figura 11.8. Diferentes especies de levaduras utilizadas para el control biológico del moho gris producido por *B. cinerea* 614

Figura 11.9. *Trichoderma koningiopsis* seleccionada para el control biológico de patógenos foliares y del suelo 615

Figura 11.10. Selección de un entomopatógeno para el control de las moscas blancas 616

Figura 11.11. Control biológico de la polilla guatemalteca de la papa con baculovirus 616

Figura 11.12. Síntomas del mildeo polvoso de las gramíneas, causado por *B. graminis* en trigo 617

Figura 11.13. Del aislamiento a la selección de potenciales biocontroladores para el control del mildeo polvoso de las gramíneas *B. graminis* 618

Capítulo 12

Desarrollo y escalamiento de bioplaguicidas

Figura 12.1. Etapas para el desarrollo de un bioplaguicida microbiano y duración típica de las etapas de acuerdo con la experiencia de AGROSAVIA en Colombia 633
Figura 12.2. Prototipos de formulación 642
Figura 12.3. Modelo de negocio Canvas 663
Figura 12.4. Esquema de estrategias usadas en la optimización de medios de cultivo 666
Figura 12.5. Biorreactores de tanque agitado (str) usados para la producción de bioplaguicidas 669
Figura 12.6. Estrategia de escalamiento basada en la capacidad de control del sistema 675
Figura 12.7. Etapas típicas para la obtención de un bioplaguicida granulado en piloto 676
Figura 12.8. Productos bioplaguicidas registrados por AGROSAVIA 678

Capítulo 13

Marco regulatorio para el registro de bioplaguicidas

Figura 13.1. Requerimientos generales para el registro de bioplaguicidas a nivel mundial 696
Figura 13.2. Número de bioplaguicidas registrados a nivel mundial 697
Figura 13.3. Lecabiol® es un granulado dispersable para el control de mosca blanca 703
Figura 13.4. Presentación del bioinsecticida Lecabiol® 704

Capítulo 14

Investigación, desarrollo y registro de enemigos naturales para control biológico. Caso: *Phytoseiulus persimilis*

Figura 14.1. Ácaros depredadores 722
Figura 14.2. Fases de producción masiva de ácaros depredadores en plantas de fríjol 724
Figura 14.3. Producción masiva de ácaros plaga 725
Figura 14.4. Producción masiva de ácaros plaga 726
Figura 14.5. Proceso de limpieza y empaque del producto 728
Figura 14.6. Producto final AcariRaptor®, producido y distribuido por Bichopolis, en envases de 60 cc y 100 cc 729
Figura 14.7. Efecto de los ácaros depredadores *P. persimilis* sobre el porcentaje de incidencia del ácaro *T. urticae* en un cultivo de rosa durante el periodo 2010-2017 en la empresa Ságaro Flowers S. A 732
Figura 14.8. Consumo de ingrediente activo en kg/ha al año en la finca de rosas Ságaro Flowers S. A. de la sabana de Bogotá donde se ha implementado el control biológico de ácaros mediante liberaciones periódicas de los depredadores *P. persimilis* 733

Figura 14.9. Porcentaje de costos asociados a las diferentes estrategias de manejo de insectos plagas y de enfermedades en cultivo de rosas en el periodo 2009-2017 733

Capítulo 15

Investigación, desarrollo y escalamiento de feromonas de insectos

Figura 15.1. Esquema simplificado del proceso de investigación y desarrollo de feromonas 746
Figura 15.2. Ejemplos de bioensayos utilizados en el estudio de feromonas 748
Figura 15.3. Métodos de extracción o aislamiento de feromonas 749
Figura 15.4. Cromatografía de gases acoplada a electroantenografía 753
Figura 15.5. Ejemplos de feromonas formuladas 755

Capítulo 16

Comercialización de agentes de control biológico

Figura 16.1. Matriz de oportunidades en el sector de agronegocios 788
Figura 16.2. Marco para analizar el ritmo de la sustitución tecnológica 789

Capítulo 17

El control biológico en un contexto de manejo integrado de enfermedades

Figura 17.1. Principales componentes del manejo integrado de enfermedades 799
Figura 17.2. Suelo saludable con capacidad continua para funcionar como un ecosistema vital que sustenta plantas, animales y humanos 800
Figura 17.3. Interacciones microbianas y su relación con el control biológico de fitopatógenos 803
Figura 17.4. Factores que pueden afectar la actividad de los biocontroladores 810

Capítulo 18

El control biológico en el contexto de un manejo integrado estratégico de insectos plaga

Figura 18.1. Comparación entre el crecimiento en el rendimiento global en cultivos de cereales, frutas y hortalizas y el uso de plaguicidas químicos 827
Figura 18.2. Dinámica de una plaga en la que se muestra la relación entre el umbral de daño económico (UDE) y el umbral económico (UE) 828
Figura 18.3. Relación teórica entre daño y rendimiento de un cultivo 829
Figura 18.4. Ejemplos hipotéticos de planes de muestreo secuencial 831
Figura 18.5. Ejemplo hipotético de un plan de muestreo de intensidad variable 833
Figura 18.6. Ciclo adaptativo de sistemas complejos aplicado al control de plagas en sistemas agrícolas a escala regional 834

Sección IV

El futuro del control biológico

Capítulo 19

Los hongos endófitos en control biológico de fitopatógenos e insectos plaga

Figura 19.1. Efectos de la inoculación de plantas con hongos endófitos 856

Figura 19.2. La emisión de compuestos orgánicos volátiles (VOC) de una planta puede ser modificada por la colonización con hongos endófitos que producen cambios en la comunicación química entre la planta y los demás organismos que interactúan con ella 860

Figura 19.3. Plantas de tomate *Solanum lycopersicum* inoculadas con el endófito *Beauveria bassiana* EABb 04/01-Tip que modificaron la composición de los compuestos orgánicos volátiles emitidos, lo cual aumentó directamente el comportamiento de oviposición de *Helicoverpa armigera* en comparación con plantas no inoculadas o inoculadas con otros endófitos 861

Figura 19.4. Microorganismos endófitos aislados de diferentes órganos de la planta de cacao 864

Capítulo 20

Nuevas estrategias para el control biológico de fitopatógenos

Figura 20.1. Consorcios microbianos y salud vegetal 883

Figura 20.2. Múltiples efectos de los microorganismos biocontroladores 886

Figura 20.3. Equipos comúnmente utilizados en screening de alta eficiencia 888

Figura 20.4. Control biológico de bacterias fitopatógenas con fagos. Ciclo de vida 892

Figura 20.5. Mecanismo general de ARN interferente 907

Capítulo 21

Nuevas estrategias para el control biológico de insectos

Figura 21.1. Microesclerocios de *Beauveria pseudobassiana* 928

Figura 21.2. Esquema de la estrategia de control de insectos plaga mediante ARNi 931

Figura 21.3. Efecto de la combinación de un nucleopoliedrovirus y un granulovirus sobre *Spodoptera frugiperda* 940

Capítulo 22

Las ómicas en el control biológico

Figura 22.1. Flujo de trabajo para secuenciación de ADN y ARN 956

Figura 22.2. Flujo de trabajo para hibridación en microarreglos 958

Figura 22.3. Flujo de trabajo para estudios proteómicos 960

Figura 22.4. Esquema del procesamiento de datos obtenidos mediante secuenciación masiva 962

Figura 22.5. Enfoques holísticos en biología 979

Capítulo 23

Los volátiles microbianos y su potencial en el control biológico de fitopatógenos e insectos

Figura 23.1. Esquema general de la función de los mVOC en el control de patógenos e insectos 993

Figura 23.2. Tipo de bioensayo utilizado para determinar el efecto de los volátiles producidos por el hongo *Fusarium culmorum* sobre el crecimiento de la cebada 995

Figura 23.3. Bioensayo en caja de Petri subdividida para observar el efecto de mVOC sobre el crecimiento de *Cochliobolus sativus* 996

Capítulo 24

Cambio climático, epidemiología vegetal y control biológico de fitopatógenos

Figura 24.1. Sistema agrícola de producción de semilla de papa en los Andes colombianos 1018

Figura 24.2. Sistema de producción de papa completamente cubierto por ceniza volcánica en Tungurahua, Ecuador 1019

Figura 24.3. Vientos fuertes generando una tormenta de arena sobre el Suroeste de los Estados Unidos en agosto del 2015. 1021

Figura 24.4. Síntomas típicos de la fusariosis de la espiga del trigo o FHB 1022

Figura 24.5. Campo de trigo con los síntomas típicos de la fusariosis de la espiga del trigo o FHB, durante la epidemia ocurrida en el estado de Nebraska, EE. UU., entre el 2007 y el 2010 1023

Figura 24.6. Cultivo de papa en los Andes ecuatorianos con síntomas de virus 1024

Capítulo 25

Cambio climático y control biológico de insectos: visión y perspectiva de la situación

Figura 25.1. Adulto de la langosta llanera *Rhammatocerus schistocercoides* Rehn 1042

Figura 25.2. Pastos nativos de los llanos orientales invadidos por brotes poblacionales de la langosta llanera *R. schistocercoides* 1044

Figura 25.3. Ninfa de *R. schistocercoides* afectada por el entomopatógeno *M. anisopliae* 1045

Figura 25.4. Ubicación del área de estudio 1046

Figura 25.5. Relación de áreas climáticamente adecuadas de *Hypothenemus hampei* en la Sierra Nevada de Santa Marta. 1048

Figura 25.6. Relación de áreas climáticamente adecuadas de *Hypothenemus hampei* en la región central de la zona cafetera 1049

Lista de tablas

Volumen 1

Sección I

Control biológico de enfermedades vegetales

Capítulo 1

Control biológico de patógenos foliares

Tabla 1.1. Hábitats microbianos filosféricos asociados a las plantas 73

Tabla 1.2. Principales virus atenuados usados para la protección cruzada en plantas 91

Tabla 1.3. Microorganismos utilizados como principios activos de bioplaguicidas, recomendados para el control de patógenos foliares que presentan registro en la Unión Europea (UE) y en Estados Unidos (EE. UU.) 115

Capítulo 2

Control biológico de fitopatógenos del suelo

Tabla 2.1. Compuestos orgánicos y enzimas liberadas por las plantas en los exudados de la raíz y su función en la rizosfera 154

Tabla 2.2. Microorganismos como ingredientes activos de bioplaguicidas para el control de patógenos del suelo que presentan registro en Europa (UE) y en Estados Unidos de América (EE. UU.) 178

Tabla 2.3. Microorganismos biocontroladores registrados en Colombia como bioplaguicidas para el control de patógenos del suelo 183

Tabla 2.4. Bioplaguicidas registrados en Brasil en junio de 2017 y biofungicidas recomendados para el control de *Sclerotinia sclerotiorum* 189

Capítulo 3

Control biológico de patógenos en poscosecha

Tabla 3.1. Microorganismos antagonistas utilizados para el control de enfermedades poscosecha en hortalizas, raíces y tubérculos 232

Tabla 3.2. Ejemplo de biofungicidas registrados para el control de patógenos poscosecha 243

Sección II
Control biológico de insectos plagas

Capítulo 5

Bacterias entomopatógenas en el control biológico de insectos

Tabla 5.1. Efecto de las familias de toxinas Cry sobre órdenes de insectos 306

Tabla 5.2. Serovariedades de *Bacillus thuringiensis* conocidas hasta la fecha 309

Tabla 5.3. Limitaciones de la serotipificación de cepas de *B. thuringiensis* conocidas hasta la fecha 310

Tabla 5.4. Productos a base de *Bacillus thuringiensis* registrados en Colombia 323

Capítulo 6

Hongos entomopatógenos en el control biológico de insectos plaga

Tabla 6 .1. Bioplaguicidas a base de hongos entomopatógenos para el control de insectos plaga registrados en diversos países 345

Tabla 6.2. Frecuencias de aplicación de *L. lecanii* en cultivos de algodón y berenjena en la costa atlántica y en el interior de Colombia 351

Tabla 6.3. Evaluación de parcelas MIC y convencionales en cultivos de algodón y berenjena en la costa atlántica y en el interior del país 352

Tabla 6.4. Bioplaguicidas producidos en Colombia para el control de insectos 354

Tabla 6.5. Vida útil y recomendaciones de almacenamiento de algunos bioplaguicidas comerciales a base de hongos entomopatógenos 358

Capítulo 7

Virus entomopatógenos en el control biológico de insectos

Tabla 7.1. Características de las principales familias y géneros de los virus entomopatógenos 374

Tabla 7.2. Ejemplo de productos a base de baculovirus registrados y comercializados a nivel mundial 389

Tabla 7.3. Principales factores ambientales que afectan la persistencia viral 393

Tabla 7.4. Persistencia de algunas especies de baculovirus expuestos a la radiación solar 395

Tabla 7.5. Etapas en el proceso de producción masiva de virus entomopatógenos 396

Capítulo 8

Las feromonas en el control de insectos

Tabla 8.1. Ejemplos de las feromonas estudiadas a nivel mundial como atracticidas de insectos 424

Tabla 8.2. Ejemplo de feromonas estudiadas a nivel mundial para captura masiva de insectos 426

Tabla 8.3. Ejemplo de feromonas estudiadas a nivel mundial para interrupción de la cópula de insectos 428

Tabla 8.4. Ejemplos de productos a base de feromonas disponibles en el mercado internacional y sus aplicaciones 440

Tabla 8.5. Listado de feromonas sintéticas registradas en Colombia para su uso en agricultura convencional y ecológica 441

Capítulo 9

Uso de depredadores como agentes de control biológico para insectos plaga

Tabla 9.1. Características de las introducciones a África de las especies de fitoseídos provenientes de Colombia entre 1983 y 1990 470

Capítulo 10

Uso de parasitoides en el control biológico de insectos plaga en Colombia

Tabla 10.1. Artículos publicados en la Revista Colombiana de Entomología sobre agentes de control biológico entre 1975 y 2016 489

Tabla 10.2. Producción comercial de parasitoides en Colombia 490

Tabla 10.3. Especies de parasitoides (Hymenoptera) de moscas blancas reportadas en Colombia 496

Tabla 10.4. Listado de parasitoides de moscas de las frutas en Colombia 500

Tabla 10.5. Especies de parasitoides de moscas de la fruta y frutales asociados en Colombia 502

Tabla 10.6. Parasitoides exóticos de las moscas de las frutas (Diptera: Tephritidae) liberados en las plantaciones guayaberas de las fincas El Recuerdo, Las Lechuzas y Monterrey (Guavatá, Santander), durante 1984-1985 506

Volumen II

Sección III

Implementación del control biológico

Capítulo 12

Desarrollo y escalamiento de bioplaguicidas

Tabla 12.1. Función de los excipientes utilizados en la elaboración de bioplaguicidas 644

Tabla 12.2. Estudios de preformulación y formulación en el desarrollo de bioplaguicidas a base de entomopatógenos 646

Tabla 12.3. Bioplaguicidas desarrollados por Corpoica 648

Tabla 12.4. Trabajos registrados en la literatura en los que se evalúa la compatibilidad de un microorganismo biocontrolador con agroquímicos 652

Tabla 12.5. Resumen de diseños de experimentos y técnicas de optimización utilizadas en el desarrollo de medios de cultivo para ingredientes activos de bioplaguicidas 668

Capítulo 13

Marco regulatorio para el registro de bioplaguicidas

Tabla 13.1. Diferencias entre Estados Unidos y la Unión Europea en el marco regulatorio para el registro de bioplaguicidas 699

Tabla 13.2. Número de bioproductos registrados y disponibles en varios países de Asia 702

Tabla 13.3. Marco regulatorio para el registro de bioplaguicidas en Colombia 703

Capítulo 14

Investigación, desarrollo y registro de enemigos naturales para control biológico. Caso: *Phytoseiulus persimilis*

Tabla 14.1. Comparación de ciclos de vida en días de *T. urticae* y *P. persimilis* a 20 °C 723

Tabla 14.2. Escala para la determinación de la incidencia de *T. urticae* en cultivos de ornamentales 729

Tabla 14.3. Comparativo de métodos de producción masiva de ácaros depredadores en la sabana de Bogotá 730

Tabla 14.4. Empresas dedicadas a la producción o la importación de enemigos naturales en Colombia registradas ante el Instituto Colombiano Agropecuario 737

Capítulo 16

Comercialización de agentes de control biológico

Tabla 16.1. Adquisiciones, alianzas y fusiones de empresas externas en Brasil 771

Tabla 16.2. Empresas líderes en el mercado de bioplaguicidas y sus ofertas 774

Sección IV

El futuro del control biológico

Capítulo 19

Los hongos endófitos en control biológico de fitopatógenos e insectos plaga

Tabla 19.1. Factores que se deben tener en cuenta para que un microorganismo endófito sea comercialmente exitoso 865

Capítulo 20

Nuevas estrategias para el control biológico de fitopatógenos

Tabla 20.1. Ejemplos de fagos usados para el control biológico de bacterias fitopatógenas 894

Tabla 20.2. Ejemplo de elicitores bióticos de uso común 903

Capítulo 22

Las ómicas en el control biológico

Tabla 22.1. Tecnologías de secuenciación de segunda y tercera generación 961

Tabla 22.2. Bases de datos de genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica 963

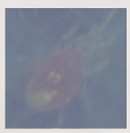
Sección III

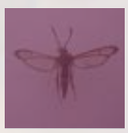
Implementación del control biológico

Capítulo 11
Diseño conceptual, selección y prueba de concepto de microorganismos biocontroladores

Capítulo 12
Desarrollo y escalamiento de bioplaguicidas

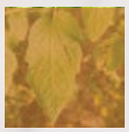
Capítulo 13
Marco regulatorio para el registro de bioplaguicidas


Capítulo 14
Investigación, desarrollo y registro de enemigos naturales para control biológico. Caso: *Phytoseiulus persimilis*


Capítulo 15
Investigación, desarrollo y escalamiento de feromonas de insectos

Capítulo 16
Comercialización de agentes de control biológico

Capítulo 17
El control biológico en un contexto de manejo integrado de enfermedades


Capítulo 18
El control biológico en el contexto del manejo integrado estratégico de insectos plaga

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,[1] Xavier Fargetton,[1] Jürgen Köhl[2]

[1] Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA)

[2] 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 *in vitro* 603
- Bioensayos *in vivo* 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 microrganismos 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) (Suhandono, 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 (Aw) y otros factores influencian 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, Moënne-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 fríjol (Cotes, Lepoivre, & Semal, 1996) también tienen una alta correlación con las actividades de celulasa, β-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.

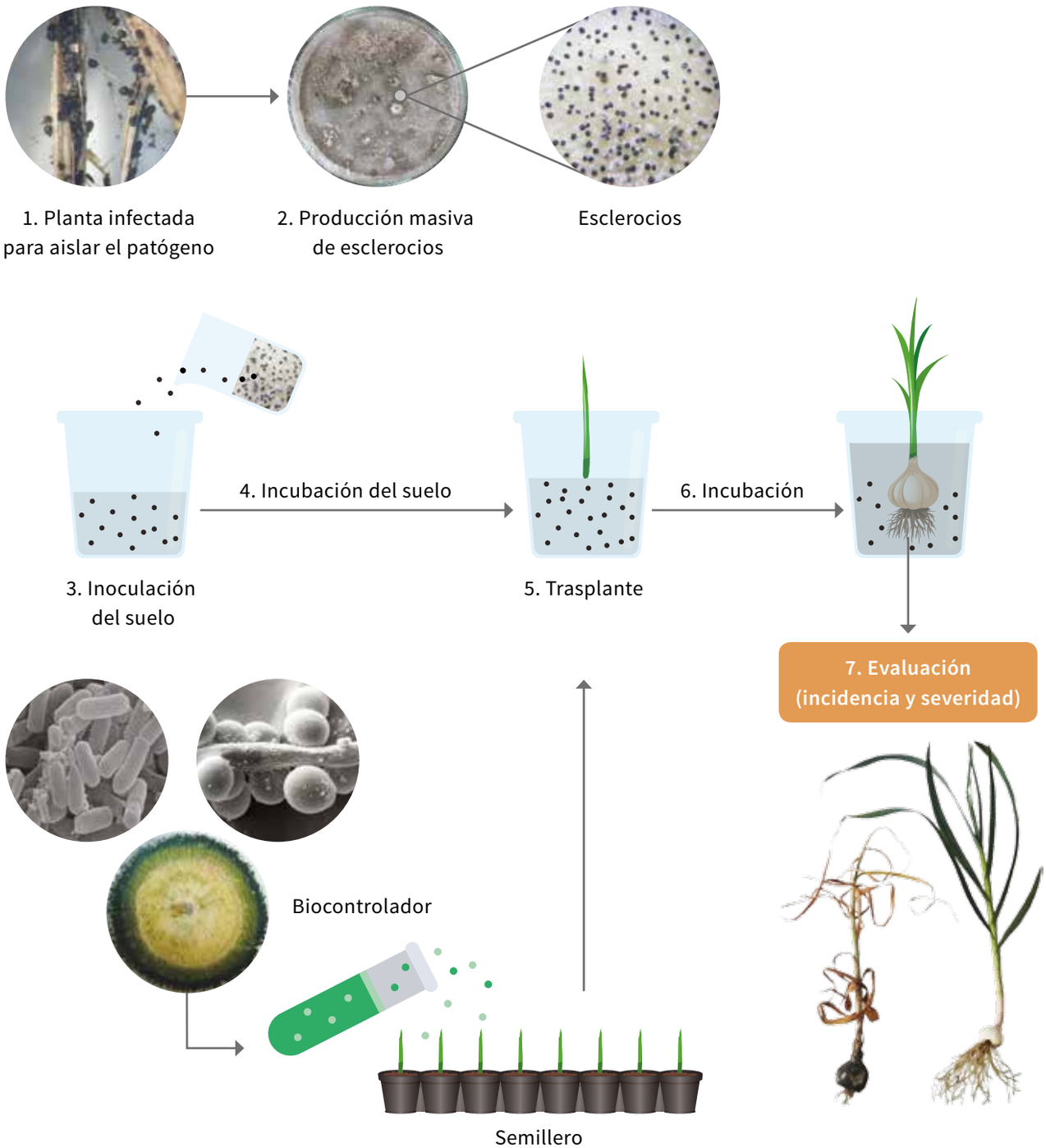
Los ensayos de semicampo, como los que se hacen en invernaderos o cámaras climatizadas y en los que se utilizan condiciones controladas, son esenciales para demostrar que los microorganismos seleccionados en laboratorio son eficaces en las condiciones normales del cultivo.

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

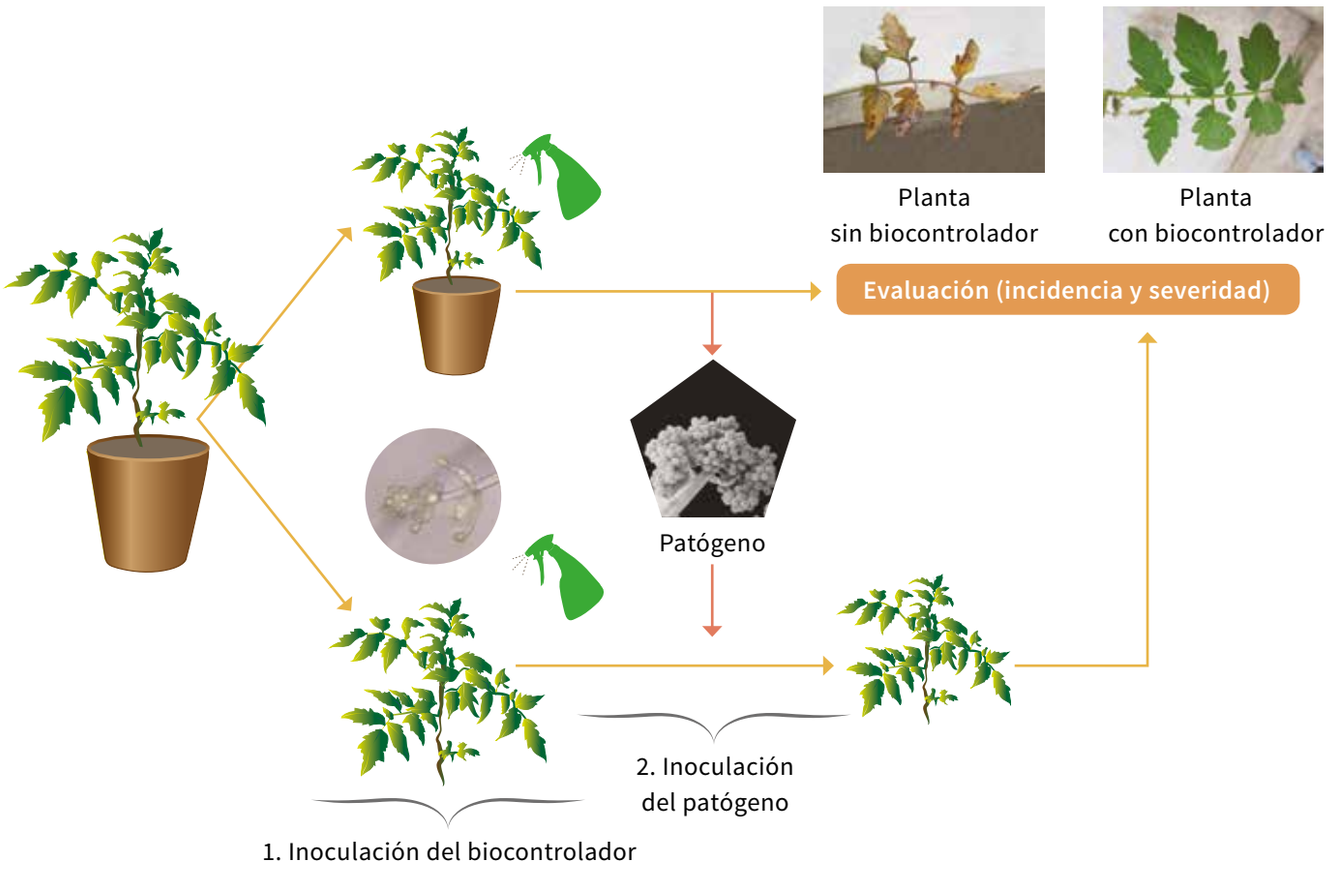


Figura 11.3. Ejemplo de bioensayo para seleccionar biocontroladores de patógenos foliares. Caso: *Trichoderma* spp. para el control del moho gris *Botrytis cinerea* en el tomate.

Fuente: Elaboración propia

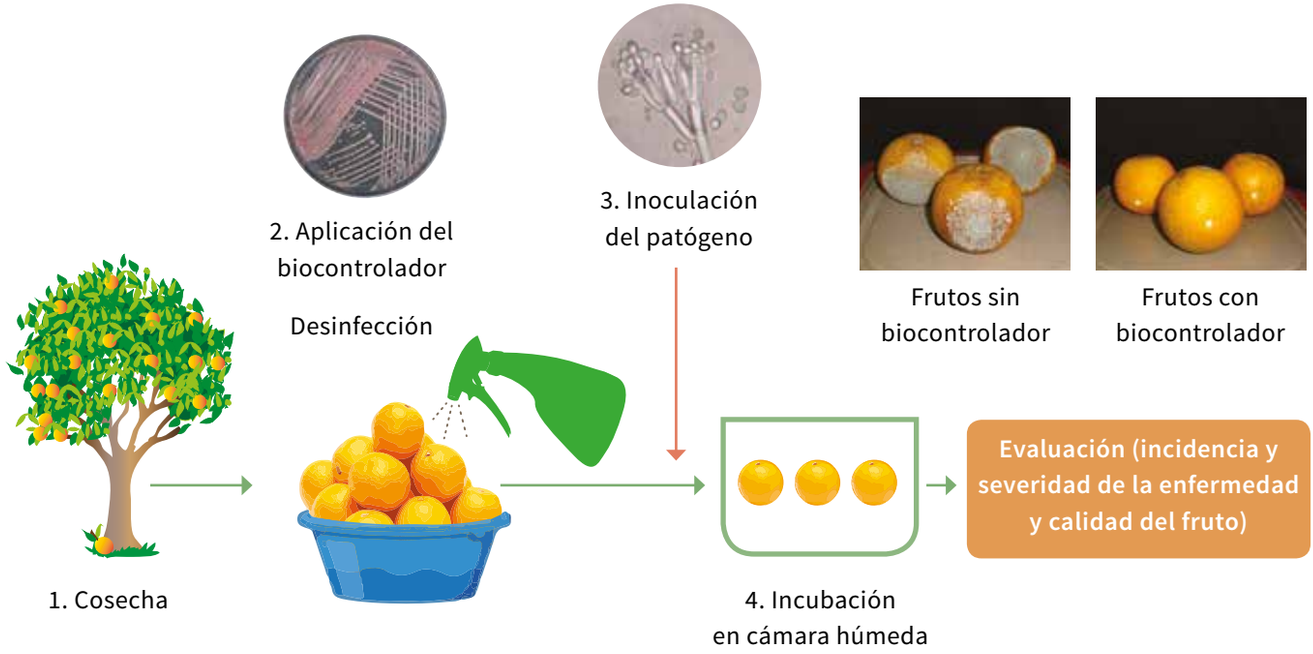
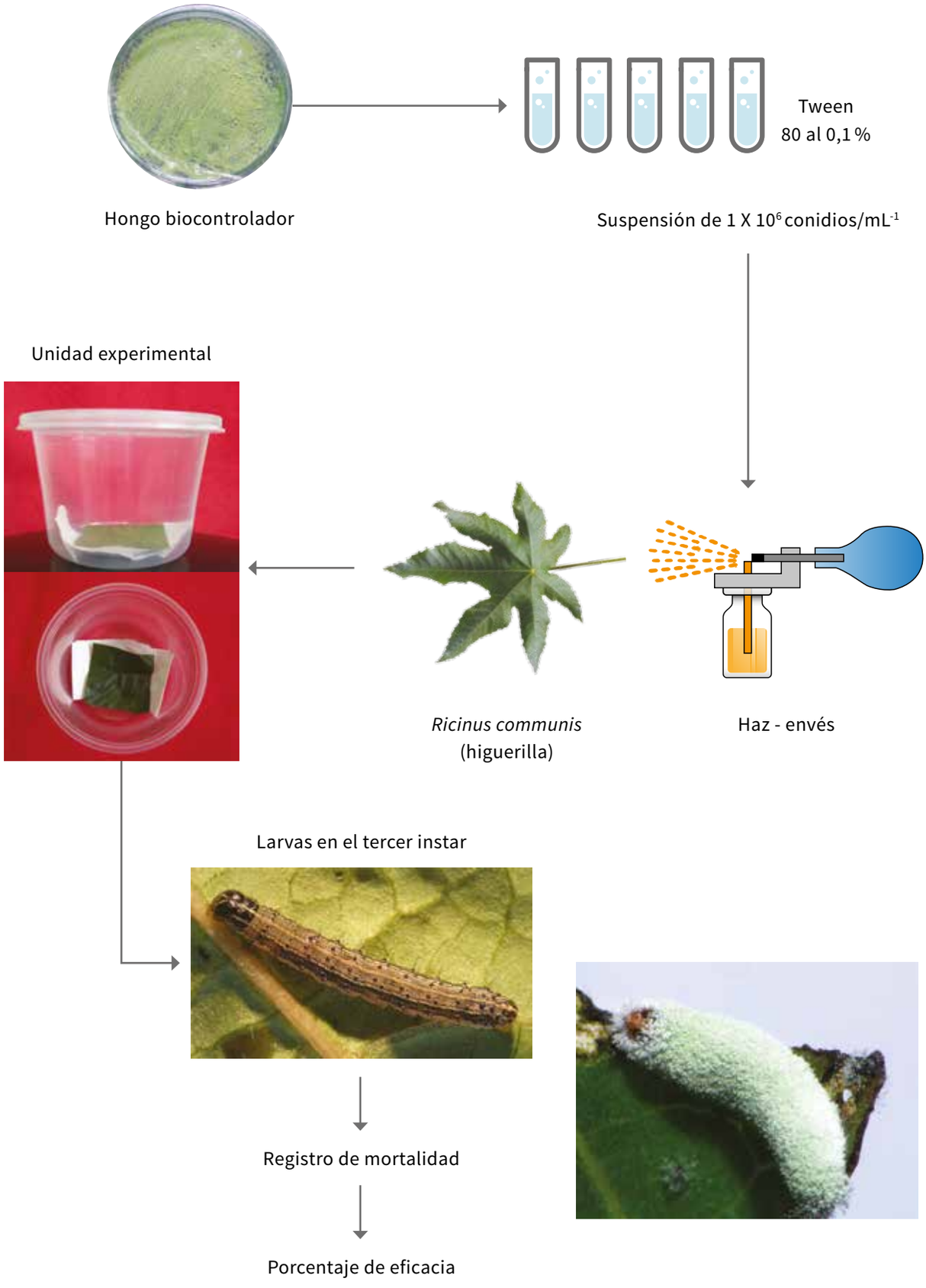


Figura 11.4. Ejemplo de bioensayo para seleccionar biocontroladores de patógenos en poscosecha. Caso: levaduras para el control del moho verde de la naranja.

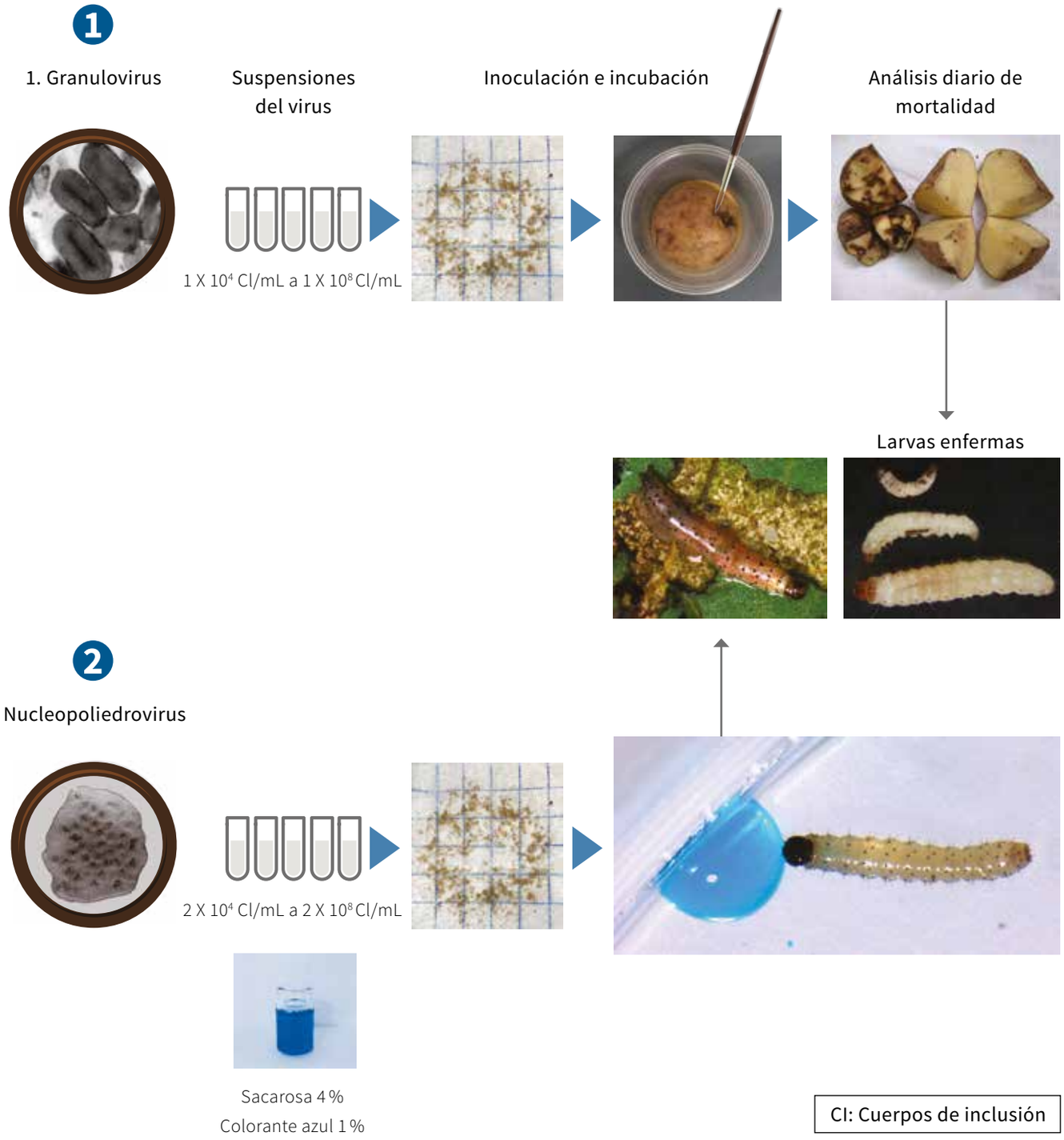
Fuente: Elaboración propia



Fotos: Grupo de Control Biológico de Corpoica

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



Fotos: Grupo de Control Biológico de Corpoica

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 *Tecia 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 (Aw), 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 fitopatógenos, 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 (μmax, 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 fríjol, 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 metabólica 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), fríjol (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 fríjol 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 x 108 conidios/ml^{-1} y 1,75 x 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 Vl 026, 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* Vl026, 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 Vl026 (*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 Vl026 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* Vl026 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* Vl026, 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.

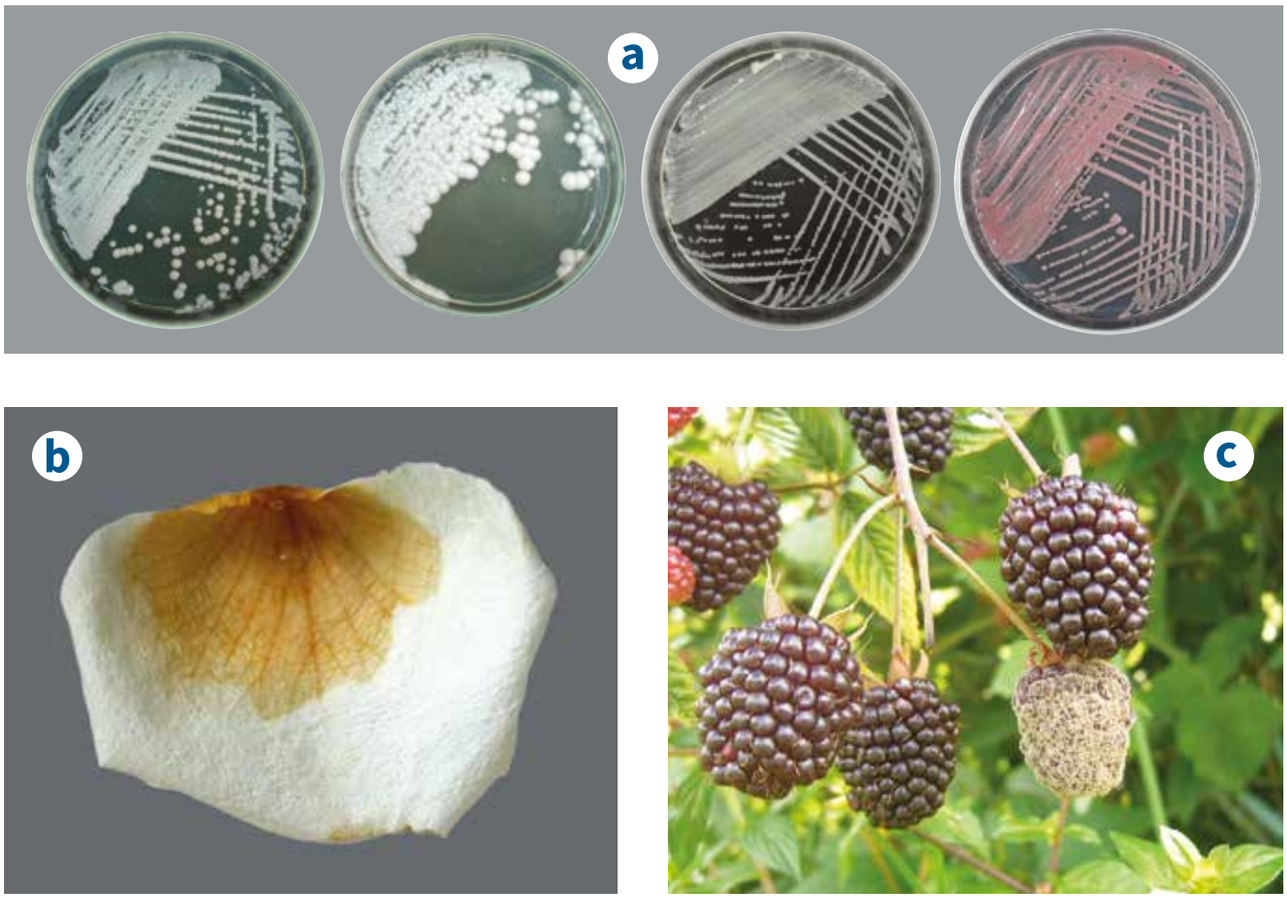
Sin embargo, con el ánimo de disponer de aislamientos nativos de baculovirus, se hizo un muestreo de larvas de *T. solanivora* colectadas en 19 municipios, localizados en los cinco departamentos productores de papa del país, y se obtuvieron 377 muestras. Mediante microscopía óptica de campo oscuro, se 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.

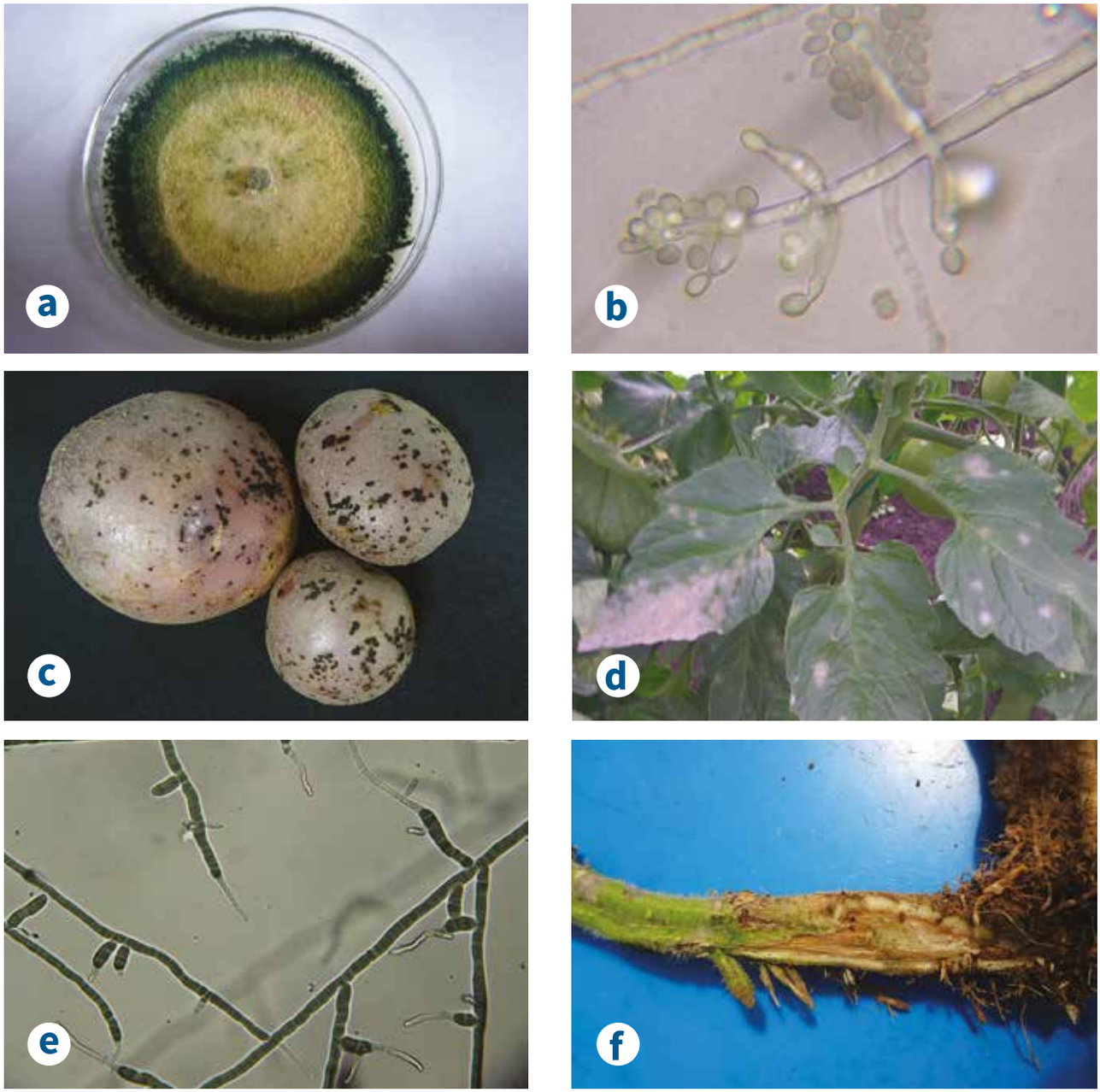
El análisis mediante patrones de restricción del ADN reveló la presencia de tres variantes genotípicas (Espinel-Correal et al., 2010; Léry et al., 2008).

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 x 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 mildeo polvoso en gramíneas, incluyendo trigo y cebada (figura 11.12), algunos de los principales cultivos a nivel mundial (Organización de las Naciones

Foto: Jurgen Kohl

Figura 11.12. Síntomas del mildeo 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 mildeo 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 x 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 (Aw: 0,95 y Aw: 0,91) y los tolerantes a luz UVB, los cuales pudieron crecer después de una exposición de entre 1 W/m^2 y 4 W/m^2 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).

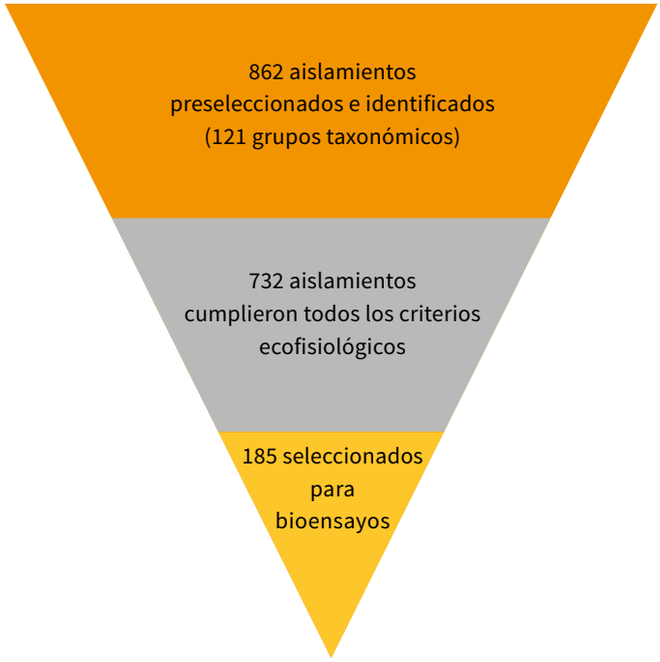


Figura 11.13. Del aislamiento a la selección de potenciales biocontroladores para el control del mildeo polvoso de las gramíneas *B. graminis*.

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 Tibaitatá 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.

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 fique. *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.

Cuartas, 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 PGPR. *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., Zeddam, 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., Zeddam, 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., Zeddam, 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 Spongospora 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 entomopahtogenic 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 fríjol *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.

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., Cotes, 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.

Capítulo 12

Desarrollo y escalamiento de bioplaguicidas

Chapter 12

Development and scaling of biopesticides

Andrés Díaz García,[1] Martha Isabel Gómez Álvarez,[1]
Erika Paola Grijalba Bernal,[1] Adriana Marcela Santos Diaz,[1]
Fredy Mauricio Cruz Barrera,[1] Diana Marcela León Moreno,[1]
Erika Andrea Alarcón Torres,[1] Alba Marina Cotes[1]

[1] Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA)

Contenido

Introducción 632

Información previa para el desarrollo de bioplaguicidas 632

- Vigilancia tecnológica 632
- Estudio de prefactibilidad 634
- Posible opción de negocio 634

Desarrollo del bioplaguicida 634

- Diseño de medios de cultivo 635
- Selección del tipo de fermentación 636
- Formulación 640
- Evaluación de la compatibilidad de bioplaguicidas con agroquímicos 645
- Control de calidad de bioplaguicidas 655
- Estabilidad de bioplaguicidas en condiciones de almacenamiento 657
- Estudios de eficacia 658
- Modelo de negocios 663
- Potencial de mercado 664

Escalamiento piloto de bioplaguicidas 665

- Optimización de medios de cultivo 665
- Escalamiento del proceso de producción masiva de los microorganismos biocontroladores 669
- Cambio de escala de operaciones unitarias "aguas abajo" 674
- Ajuste y cambio de escala de las formulaciones 677
- Costos de producción 677
- Estrategias de mercadeo 678

Registro y transferencia de la tecnología 679

- Registro 679
- Implementación del modelo de negocio 679

Conclusiones y perspectivas 680

Agradecimientos 681

Referencias 682

Resumen

Como se mostró en el capítulo anterior, el desarrollo tecnológico de un bioplaguicida inicia con la etapa de prueba, la cual enmarca una serie de actividades e iniciativas de carácter investigativo y experimental para generar una línea base apropiada para la aplicación de las etapas posteriores. En el presente capítulo se exponen con detalle las etapas de desarrollo, escalamiento piloto, registro y transferencia de la tecnología, que permitirán la implementación exitosa de un bioplaguicida. Inicialmente se debe acopiar, analizar y hacer una primera toma de decisiones sobre los candidatos o aislamientos más apropiados, a partir de la información generada por los estudios de vigilancia tecnológica y prefactibilidad (basados en una posible opción de negocio preliminar). En la etapa de desarrollo se selecciona el tipo de fermentación, se termina el diseño del medio de cultivo, se realizan las pruebas de compatibilidad con agroquímicos, se estandarizan los métodos de control de calidad, se determina la estabilidad en almacenamiento de los prototipos de formulación y su eficacia, y se define el modelo de negocios y el potencial de mercado. En la etapa de escalamiento piloto se optimiza el medio de cultivo, se realiza el escalamiento tanto de la producción masiva por fermentación como de la formulación, se calculan los costos de producción y se implementan estrategias de mercadeo. En la última etapa, se lleva a cabo el registro del producto, la transferencia de la tecnología y la implementación del modelo de negocios. La suma de todas estas actividades implica que el desarrollo tecnológico de un bioplaguicida se considere como una tecnología de mediano plazo (entre 4 y 5 años), que requiere de una inversión de alto costo. La aplicación de las etapas mencionadas requiere de una organización robusta y eficiente, a cargo de un personal multidisciplinario (idóneo para el uso efectivo de recursos logísticos y técnicos; para el manejo de información experimental, económica y legal; y para la gestión administrativa), capaz de abordar todos los retos asociados a la optimización, escalamiento y registro de bioplaguicidas en Colombia.

Palabras clave

Bioplaguicidas microbianos, escalamiento, fermentación, formulación, optimización, transferencia de tecnología

Abstract

As shown in the previous chapter, the technological development of a biopesticide begins with the proof of concept stage that involves a series of activities and initiatives of investigative and experimental nature to generate an appropriate baseline for the application of the further stages. In this chapter, the stages of development, pilot scaling, registration and transfer of the technology that allow the successful implementation of a biopesticide are discussed in detail. Initially it is necessary to collect, analyze and make a first decision about the most appropriate candidates or isolates based on the information generated by the studies of technological surveillance and prefeasibility, based on a possible initial business option. In the development stage, the type of fermentation is selected, the design of the culture medium is finished, the tests of compatibility with agrochemicals are carried out, the quality control methods are standardized, the storage stability of the formulation prototypes and their efficiency are determined and the business model and the market potential are defined. In the pilot scaling stage, the culture medium is optimized, mass production by fermentation and formulation are scale-up, production costs are calculated and marketing strategies are implemented. In the last stage the registration, transfer of technology and implementation of the business model are carried out. The sum of all these activities allows to visualize that the technological development of a biopesticide can be considered as a medium-term technology (between 4 and 5 years), which requires an investment of several million dollars. As will be evident throughout the text, the application of this stages requires of a robust and efficient organization by a suitable multidisciplinary staff for the effective use of logistical and technical resources, experimental, economical and legal information analysis, and administrative management to address all the challenges associated with the optimization, scaling and registration of biopesticides in Colombia.

Keywords

Fermentation, formulation, microbial biopesticides, optimization methods, scaling, technology tranfer

Introducción

En líneas generales, el desarrollo de bioplaguicidas tiene una relación estrecha con el estudio y explotación de la biotecnología moderna, por lo tanto, para que las entidades relacionadas con tales iniciativas (industria, universidades y centros de investigación, entre otros) puedan generar innovación y desarrollo tecnológico requieren de en un recurso humano altamente calificado de carácter multidisciplinario (Chaparro et al., 2013).

En este contexto, se puede entender el desarrollo tecnológico como la utilización de los conocimientos científicos existentes para la producción de nuevos materiales, dispositivos, productos, procedimientos, sistemas o servicios, así como para su mejora sustancial, lo cual incluye la realización de prototipos y de instalaciones piloto (Instituto Vasco de Estadística [Eustat], s. f.). Sin embargo, el desarrollo tecnológico de un bioplaguicida microbiano es una tarea compleja que involucra no solo etapas de carácter técnico científico, sino también etapas asociadas al análisis de viabilidad económica y de potencial del mercado, así como el cumplimiento de regulaciones y reglamentaciones nacionales para bioproductos, (todas las cuales se deben tener en cuenta desde la concepción misma de la idea de investigación).

Otros aspectos importantes en el desarrollo de un bioplaguicida son los costos de implementación y ejecución, la complejidad relativa y la duración de cada etapa. Como se muestra en la figura 12.1, a medida que se avanza en el desarrollo tecnológico se van tamizando los posibles microorganismos o aislamientos candidatos, pero, a su vez, los costos, la complejidad y el tiempo requerido aumentan debido a las múltiples pruebas, bioensayos, análisis y estudios que deben surtirse para asegurar la eficiencia y reproducibilidad del bioproducto en condiciones controladas, semicontroladas y de campo. Una vez ejecutadas todas las etapas del desarrollo de un bioplaguicida (que pueden tomar entre cuatro y cinco años), se puede asegurar que el desarrollo tecnológico es eficiente, efectivo y estable, lo que permite proyectar la comercialización y distribución del bioplaguicida en el mercado emergente de los bioproductos a nivel mundial.

Información previa para el desarrollo de bioplaguicidas

Gran parte de la información que sustenta el desarrollo tecnológico de un nuevo bioplaguicida se logra mediante estudios de vigilancia tecnológica y análisis de prefactibilidad, que orientan a los desarrolladores sobre las posibles opciones de negocio. Con base en este conocimiento, se inicia el proceso de desarrollo del nuevo producto. En la figura 12.1 aparecen todas las etapas que conducen a la obtención de un nuevo bioplaguicida (las relativas al diseño conceptual y a la prueba de concepto fueron discutidas en el capítulo anterior).

Vigilancia tecnológica

Según la norma UNE 166000:2011, se entiende la vigilancia tecnológica como "Un proceso organizado, selectivo y sistemático, para captar información del exterior y de la propia organización sobre ciencia y tecnología, seleccionarla, analizarla, difundirla y comunicarla, para convertirla en conocimiento, con el fin de tomar decisiones con menor riesgo y poder anticiparse a los cambios" (Aldasoro Alustiza, Cantonnet Jordi, & Cilleruelo Carrasco, 2012). Existen diferentes tipos de vigilancia tecnológica a desarrollar, y esta dependerá de lo que se quiera obtener y de la fase en que se encuentre el desarrollo del bioproducto. Entre ellas se encuentran: 1) la vigilancia comercial (asociada a mercados, competidores, productos, precios, etc.), 2) la vigilancia científica y tecnológica (que permite identificar líderes, dinámicas, campos tecnológicos y patentes, entre otros), 3) la vigilancia normativa y regulatoria (que permite conocer leyes, normativas,

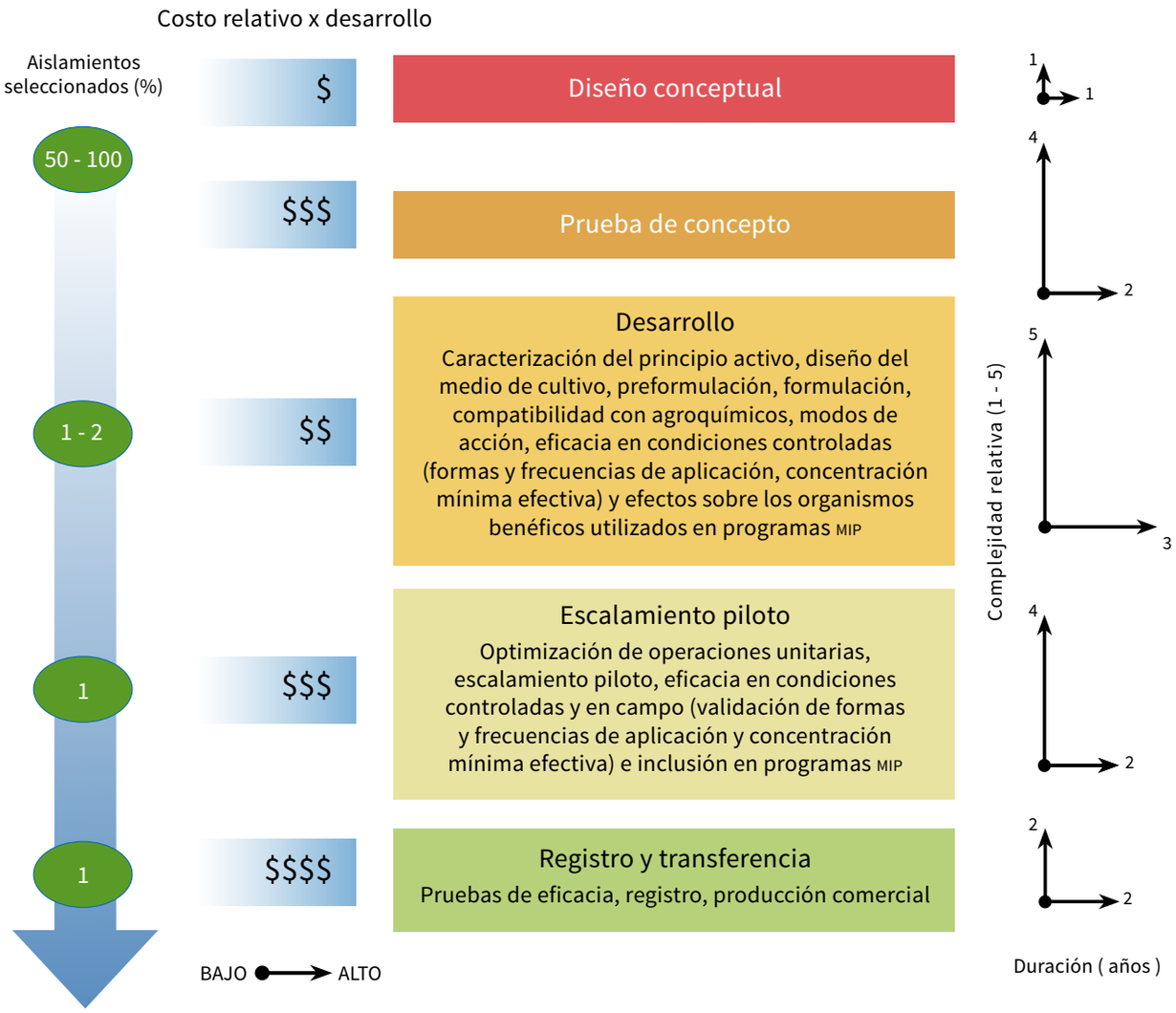


Figura 12.1. Etapas para el desarrollo de un bioplaguicida microbiano y duración típica de las etapas de acuerdo con la experiencia de AGROSAVIA en Colombia.

Fuente: Elaboración propia

tratados y acuerdos), 4) la vigilancia competitiva (asociada específicamente a identificar actores de la cadena de valor, como competidores, fabricantes, comercializadores, proveedores, etc.) (Aguilera, 2014) y 5) la vigilancia estratégica (que permite la generación y el tratamiento de ideas aplicables al desarrollo o mejora de productos y servicios, así como vigilar el entorno y explotar esta información para la toma de decisiones) (Coca, García, Santos, & Fernández, 2010).

No existe una sola metodología para las etapas de un proceso de vigilancia tecnológica, sin embargo, en general se manejan las siguientes: diagnóstico (en la cual se identifica y precisa el tema a vigilar), búsqueda y captura de la información (se diseña e implementa la estrategia de recopilación de información), análisis de la información (se filtra la información relevante), difusión y comunicación a los interesados y, finalmente, orientación en la toma de decisiones a partir de los resultados obtenidos (Observatorio Virtual de Transferencia Tecnológica [OVTT], s. f.).

Uno de los propósitos principales de la vigilancia tecnológica en el contexto del desarrollo de bioplaguicidas es anticiparse a los posibles cambios en el desarrollo tecnológico. Gracias a esto, es posible identificar sectores emergentes o nichos potenciales, reducir riesgos respecto a aquellos sectores (cultivos, tipo de bioplaguicida, etc.) que están entrando a la etapa de madurez o declive (y evitar, así, el gasto de recursos), identificar aliados y expertos para

desarrollar el bioproducto, y definir enfoques y prioridades dentro de la investigación (Cruz, 2013).

Estudio de prefactibilidad

El estudio de prefactibilidad de los bioplaguicidas contempla un estudio de mercado, un estudio técnico, un estudio financiero y un estudio organizacional y legal. En Corpoica se realiza el análisis de factibilidad del mercado utilizando la metodología *quick look*, desarrollada por la Universidad de Texas, que sirve para priorizar y definir en términos comerciales y de mercado los proyectos de desarrollo de bioinsumos (Harbert, 2012). La guía para la pertinencia del mercado de Corpoica define diferentes pasos que permiten identificar el tipo de tecnología y los beneficios que esta le puede entregar al usuario final; los mercados potenciales, el interés y las proyecciones del mercado; la selección de posibles segmentos objetivo o de interés; las tecnologías competentes y los competidores; el estado y desarrollo de la tecnología; el estado de la propiedad intelectual; las barreras de mercado, y las posibles recomendaciones (Corpoica, 2015).

El estudio técnico parte del estado actual del desarrollo del bioplaguicida, y permite un acercamiento preliminar a su definición, así como a los procesos, procedimientos y capacidades requeridas (mano de obra, equipos, maquinaria e instalaciones, entre otras). Además, permite una posible definición de las actividades que se desarrollarán y su planeación en el tiempo para determinar el momento de entrada de la tecnología en el mercado (López, González, Osobampo, Cano, & Gálvez, 2013; Miranda, 2005). El estudio financiero, por su parte, contempla el presupuesto preliminar y la cronología de las inversiones. Este estudio toma información del estudio de mercado (proyecciones generales de ventas) y del estudio técnico (costos e inversiones). De acuerdo con el nivel de información que se tenga, se puede construir un flujo de caja del proyecto con evaluación financiera (Miranda, 2005) o se plantea una hipótesis del modelo financiero que permita identificar factores claves a tener en cuenta en el desarrollo del proyecto.

Posible opción de negocio

Como parte del proceso inicial del desarrollo del bioplaguicida, se pueden evaluar las posibles opciones de negocio que van a definir la introducción de la tecnología en el mercado una vez culminado su perfeccionamiento. Esta aproximación se puede hacer teniendo en cuenta que en la industria del biocontrol se tienen diferentes opciones de negocio. La primera opción es la de la propiedad del capital, dado que el desarrollador invierte a un nivel limitado y el progreso es gradual (empresas pequeñas). La segunda es la inversión social, en la cual se realizan grandes aportes económicos antes de que se produzcan las ventas, lo que promueve un desarrollo más rápido (centros de investigación con apoyo gubernamental, por ejemplo). La tercera es la inversión de capital de riesgo, con cantidades de capital importantes que superan en gran medida las ventas, de modo que los desarrollos sean grandes y rápidos (alianzas entre centros de investigación o empresas pequeñas con inversionistas). La cuarta opción es aquella en la cual las multinacionales encuentran atractivo el tema de los bioplaguicidas y establecen una unidad de negocio para desarrollar este potencial, compran empresas que ya tienen desarrollos, hacen alianzas o generan nuevas líneas de producción (Glare & Moran-Diez, 2016; Ravensberg, 2011).

Desarrollo del bioplaguicida

En esta fase intermedia se realiza el diseño del medio de cultivo y el desarrollo o definición del sistema fermentación, se abordan estudios de preformulación, formulación, vida útil y control de calidad del nuevo producto (microbiológico, fisicoquímico, biológico). Otros aspectos importantes son la estandarización de bioensayos para la evaluación de la eficacia en condiciones controladas, la compatibilidad del bioplaguicida con agroquímicos y su efecto sobre los organismos benéficos implicados rutinariamente en el manejo integrado del cultivo (parasitoides, depredadores y polinizadores).

Diseño de medios de cultivo

El diseño de un medio de cultivo para la obtención del principio activo de un bioplaguicida es una tarea compleja, ya que está en función directa con el tipo de propágulo a producir (bacilo, espora, conidio, etc.) y requiere del mayor conocimiento posible acerca del metabolismo y la fisiología del microorganismo. Esto incluye información experimental, como los perfiles de asimilación de fuentes de carbono y nitrógeno, los rangos de crecimiento en función del pH, la temperatura, la actividad de agua, la intensidad lumínica y los requerimientos de oxígeno y agitación, entre otros. Debido a las múltiples interacciones entre el medio de cultivo y el microorganismo (bacteria, hongo, levadura o virus), es usual que el medio diseñado sea específico para el microorganismo estudiado y no se puedan garantizar resultados similares incluso con otras cepas de la misma especie. Adicionalmente, el medio de cultivo diseñado debe garantizar la estabilidad de la actividad biológica, insecticida o antagónica, aun cuando se lleve a cabo la integración de estrategias de mejoramiento del ingrediente activo (por ejemplo, potenciación de su actividad enzimática, antagonista o biocontroladora) (Singh, Yadav, Chaudhary, Rana, & Sharma, 2016).

En términos generales, el diseño de un medio de cultivo involucra la evaluación de un número significativo de factores, que incluyen la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, los macroelementos y los microelementos, así como aminoácidos y vitaminas (todos ellos como causantes del crecimiento en niveles que aumenten la productividad del proceso y reduzcan los costos de producción). Además, se deben evaluar las variables fisicoquímicas del proceso fermentativo, como la temperatura, el pH, la velocidad de agitación y la demanda de oxígeno, las cuales deben ser estudiadas y fijadas en valores adecuados.

Ya que el medio de cultivo debe garantizar la reproducibilidad del proceso, se debe considerar, especialmente en pequeña escala, el uso de medios de cultivo definidos y homogéneos (Kennedy & Krouse, 1999; Singh, Yadav et al., 2016), pues sustratos complejos, a causa de su heterogeneidad, pueden afectar la fiabilidad del agente de control producido. Sin embargo, es necesario llevar a cabo un análisis de factibilidad cuando se requiera llevar la producción a una escala superior, para asegurar la viabilidad económica del medio de cultivo. También se deben tener en cuenta otros criterios de los componentes del medio tales como la solubilidad y sedimentación en grandes tanques, el manejo, el transporte y las adecuaciones previas para asegurar la implementación de la producción industrial de los bioplaguicidas. En este punto, la selección apropiada del tipo de fermentación puede reducir considerablemente el costo total de los procesos de fermentación y purificación.

Numerosos estudios se han centrado en el diseño de medios de cultivo asociados a los ingredientes activos que constituyen los bioplaguicidas, ya sean bacterias —como *Bacillus thuringiensis* (Ennouri, Ben Hassen, & Zouari, 2013) y *Bacillus subtilis* (Chen et al., 2010)—, levaduras —como *Rhodosporidium paludigenum* (Wang, Liu, Wang, Ruan, & Zheng, 2011)—, hongos biocontroladores —como *Trichoderma* sp. (Li, Song, Li, & Chen, 2016; Zhang & Yang, 2015)— u hongos entomopatógenos —como *Verticillium* sp. (Shi, Xu, & Zhu, 2009), *Metarhizium* sp. (Bhanu Prakash, Padmaja, & Siva Kira, 2008) o *Beauveria* sp. (Petlamul & Prasertsan, 2014)—. En la mayoría de estos estudios, se distingue como factor común el uso sistemático de herramientas estadísticas con el fin de obtener altos rendimientos y productividades del ingrediente activo.

Estrategias para el diseño de medios de cultivo

Durante el diseño inicial de medios de cultivo, se pueden utilizar varias estrategias, como la evaluación de un factor a la vez o la manipulación de varios de ellos simultáneamente. Estas estrategias han sido utilizadas independientemente de la técnica de fermentación, ya sea fermentación sumergida (SmF, por su sigla en inglés) o sólida (SSF, por su sigla en inglés).

Un factor a la vez

En esta técnica, conocida como la alternativa clásica de tanteo de factores, solo uno de ellos es manipulado, mientras que los demás se mantienen constantes. Esta estrategia ha sido la más utilizada históricamente por

los investigadores en las etapas iniciales del diseño (Singh, Haque et al., 2016; González, Islas, Obregón, Escalante, & Sánchez, 1995). No obstante, la mayor limitante que se encuentra al utilizar esta estrategia radica en la dificultad de estimar las interacciones de los factores (Gupte & Kulkarni, 2003; Kennedy & Krouse, 1999; Singh, Yadav et al., 2016). Además, resulta en ocasiones tedioso, cuando existen varios factores de interés para ser evaluados.

Dentro de la estrategia de un factor a la vez se enmarcan otras variantes, tales como la *técnica de retiro*, que consiste en ir retirando un componente del medio de cultivo a la vez, para revisar el efecto que esto tiene sobre la producción de la biomasa o del metabolito de interés; la *técnica de suplementación*, que se utiliza principalmente cuando se desea conocer el efecto de varios suplementos de carbono o nitrógeno, principalmente, para evaluar su incidencia en la producción de metabolitos con actividad antifúngica (Singh, Rai, & Tripathi, 2012; Tripathi, Praveen, Singh, & Bihari, 2004); y la *técnica de reemplazo*, que básicamente utiliza la fuente de carbono o nitrógeno que muestre efectos positivos en experimentos de suplementación como única fuente de estos.

Más de un factor a la vez: diseño de experimentos

El uso de métodos estadísticos basados en el diseño de experimentos (*design of experiments* [DOE, por su sigla en inglés]) para la estandarización de medios de cultivo puede superar los cuellos de botella encontrados en la estrategia de un factor a la vez. Fisher (1992) propuso una teoría básica del diseño de experimentos que demostró que cambiar más de un factor o variable en el medio es más eficiente que cambiar cada uno de ellos de forma independiente. La mayoría de los DOE permiten la identificación y selección preliminar de 2 a 10 componentes del medio de cultivo con un limitado número de experimentos. En comparación con la estrategia de un factor a la vez, la aplicación del DOE conlleva menos tiempo, menos experimentos y menos materiales para obtener la misma cantidad de información del medio de cultivo; adicionalmente, se pueden determinar las interacciones entre los componentes del medio de cultivo (Adinarayana & Ellaiah, 2002; Keskin Gündoğdu, Deniz, Çalışkan, Şahin, & Azbar, 2016). Entre los diseños de cribado, se destacan los factoriales fraccionados (resoluciones III, IV y V), los factoriales irregulares, los factoriales irregulares mixtos, los de tipo Plackett Burman (resoluciones III, IV y V) y los diseños de Taguchi.

El diseño Plackett Burman (PBD, por su sigla en inglés) fue introducido por Plackett y Burman (1946) como solución para determinar los efectos principales en cualquier proceso. Este diseño es un modelo de dos niveles en el cual se asume que las interacciones de los factores no son significativas. Con este modelo se pueden evaluar n variables en $n+1$ experimentos, lo que lo hace muy económico en el número de tratamientos a evaluar. El PBD debe ser usado solo cuando los factores del medio de cultivo no tengan interacciones o efectos aditivos en la respuesta, de otra forma los resultados podrían ser potenciados o enmascarados por otras variables, lo que genera una interpretación errónea.

Otra alternativa son los diseños de Taguchi, basados en arreglos ortogonales que solucionan la limitante de los modelos PBD. Los arreglos ortogonales estiman los efectos de los factores en la media y la variación de la respuesta. Un arreglo ortogonal significa que el diseño es balanceado, así que los niveles de los factores se ponderan equitativamente. Por esta razón, cada factor puede evaluarse de forma independiente respecto de todos los demás, de modo que el efecto de un factor no afecta la estimación de otro. Con la aplicación de este diseño y un número relativamente pequeño de experimentos, se pueden cuantificar efectos principales e interacciones de los factores en estudio y se reconoce que no todos los factores que causan variabilidad pueden ser controlados (Aggarwal & Singh, 2005).

Selección del tipo de fermentación

El control biológico y el desarrollo de bioplaguicidas demandan una gran cantidad de principio activo (propágulos). La fermentación en estado sólido (SSF) y la fermentación sumergida (SmF) son las más usadas para la producción de estos agentes.

La principal diferencia entre las fermentaciones líquidas y las sólidas es la capacidad de mezcla. La fermentación líquida es un sistema de reacción altamente homogéneo que, en general, está perfectamente mezclado, de modo que, en cada parte del reactor y en un tiempo dado, está la misma cantidad del microorganismo, nutrientes y metabolitos (Gervais & Molin, 2003). De otra parte, la fermentación sólida es un sistema altamente heterogéneo en el que es muy difícil monitorear, controlar y homogeneizar variables de proceso tales como la temperatura, la aireación, la humedad y la concentración de nutrientes (Doelle, Mitchell, & Rolz, 1992; Pandey, 2003). Por tanto, el tipo de fermentación a usar para la obtención de un bioplaguicida depende directamente del género y especie del microorganismo, del medio de cultivo seleccionado, del tipo de propágulo a producir y del volumen de producción, entre otros factores.

Aplicaciones de la fermentación sólida

Los hongos filamentosos son los candidatos ideales para la aplicación de la fermentación sólida para la obtención de ingredientes activos de control biológico. En este sentido, los géneros *Trichoderma*, *Lecanicillium*, *Metarhizium*, *Beauveria*, *Coniothyrium* y *Clonostachys* han sido los más usados para la producción de biomasa fúngica a escala de laboratorio e industrial. Por ejemplo, Li, Song, Li y Chen (2016), quienes optimizaron un medio de cultivo sólido y el nivel de pH para *Trichoderma harzianum* SH2303, aplicaron una estrategia secuencial con un diseño Plackett-Burman seguido de un diseño Box-Behnken, con lo que obtuvieron una concentración máxima de clamidosporas de $4{,}5 \times 10^8$ esporas/ml (un aumento de ocho veces con respecto al medio sin optimizar).

Para la producción de esporas del hongo entomopatógeno *Coniothyrium minitans*, Chen, Li, Du y Chen (2005) aplicaron un diseño de experimentos Plackett Burman seguido de un diseño factorial completo para generar un modelo de segundo orden (superficie de respuesta). Este último estuvo basado en tres componentes críticos del medio de cultivo, para optimizar así el rendimiento del ingrediente activo. Al finalizar, los valores óptimos fueron de 36,43 g/l de almidón soluble, 3,91 g/l de urea y 1,02 g/l de KH_2PO_4 con un valor máximo predicho por el modelo de $9{,}94 \times 10^9$ esporas/g que se corroboró en la práctica ($1{,}04 \times 10^{10}$ esporas/g).

Para el caso del control biológico del moho gris en fresa, causado por el patógeno *Botrytis cinerea* en poscosecha, Viccini, Mannich, Capalbo, Valdebenito y Mitchell (2007) evaluaron factores fisicoquímicos (como la humedad, la concentración del inóculo y la agitación) en un medio de cultivo basado en granos de arroz a escala de laboratorio en un fermentador artesanal convencional (bolsas plásticas). La mayor producción de esporas ($3{,}4 \times 10^9$ esporas/g) se obtuvo con una humedad inicial del 46 %, una concentración de inóculo de 1×10^6 esporas/g y agitación manual cada 15 días. Estos resultados sugieren que la producción a gran escala puede ser factible, dado que se requeriría un espacio de 24 m^2 de incubación para producir suficientes esporas para el tratamiento continuado de 1 ha de plantas de fresa.

Los sistemas SSF pueden utilizar subproductos agrícolas relativamente baratos, tales como salvado de trigo, salvado de arroz y otros residuos de cereales o leguminosas (Feng, Liu, & Tzeng, 2000; Zhu, Knol, Smits, & Bol, 1996). No obstante, los sustratos para la fermentación sólida tienen algunas desventajas como las siguientes: espesor de la capa de sustrato, baja porosidad, limitada capacidad de transferencia de calor y estructuras internas que perturban la aireación y la absorción eficiente de nutrientes (Hölker & Lenz, 2005; Marín-Cervantes et al., 2008). Además, en la mayoría de los casos es imposible separar la biomasa del substrato sólido residual, de modo que la estimación directa del crecimiento no es fiable. Una alternativa viable es el uso de soportes inertes, tales como resinas de intercambio iónico y espumas de poliuretano. Los soportes inertes presentan una alta porosidad, baja densidad, absorción de agua relativamente alta y un ambiente satisfactorio para el crecimiento de hongos, donde los nutrientes de un medio líquido son absorbidos (Auria, Ortiz, Villegas, & Revah, 1995; Shi et al., 2009). El uso de soportes inertes permite la determinación directa de biomasa directa, la reutilización, extracciones más limpias, buena aireación y remoción de calor (Marín-Cervantes et al., 2008; Zhu, Smits, Knol, & Bol, 1994). Por ejemplo, con el hongo entomopatógeno *Lecanicillium lecanii*, Xu, Yu y Shi (2011) evaluaron

dos soportes inertes y tres orgánicos para la obtención de esporas, gracias a lo cual seleccionaron la espuma de poliuretano y el bagazo de caña como los más promisorios, por favorecer el crecimiento del hongo ($1{,}0 \times 10^{10}$ esporas/g soporte) y mantener una alta actividad quitinasa de los conidios (entre 2,7 y 3,3 U/mg) para su aplicación como agente biocontrolador.

Particularmente en los hongos filamentosos, la adición de compuestos inductores, la manipulación de las concentraciones de carbono y las relaciones C/N pueden alterar las características morfológicas y fisiológicas de las esporas, lo que conduce a una mayor actividad en hongos entomopatógenos (Hallsworth & Magan, 1994b; Ibrahim, Butt, & Jenkinson, 2002; Lane, Trinci, & Gillespie, 1991) y fitopatógenos (Jackson, 1997; Jackson & Schisler, 1992; Schisler, Jackson, & Bothast, 1991; Yu, Hallett, Sheppard, & Watson, 1998). Por ejemplo, para *Metarhizium anisopliae*, Ibrahim et al. (2002) demostraron que el medio de cultivo y la adición de inductores de virulencia (por ejemplo, KCl) tienen una influencia crítica no solo sobre el crecimiento de las estructuras de resistencia, sino sobre algunos eventos asociados al biocontrol, tales como la germinación de los conidios, el desarrollo de los apresorios y el crecimiento micelial; aun cuando sugieren que la virulencia depende en mayor medida de la velocidad de infección.

Por otro lado, la alteración de la actividad del agua en los medios (Aw) también puede influir favorablemente en las características morfológicas y fisiológicas (Hallsworth & Magan, 1994a; Ibrahim et al., 2002). Sin embargo, el grado de patogenicidad o virulencia de los hongos entomopatógenos (*in vivo*) en función de las condiciones de crecimiento —ya sea por fermentación sólida o líquida— no presenta consenso, por tanto, la mayoría de los casos se limita a la dependencia exclusiva del aislamiento y de su condición genotípica (Ibrahim et al., 2002). El comportamiento de las esporas está ligado a los cambios fisiológicos relacionados con la concentración de carbohidratos intracelulares, por ejemplo, los polioles se correlacionaron con la germinación (Al-Hamdani & Cooke, 1987; Hallsworth & Magan, 1994a) y los disacáridos no reductores, con la tolerancia a la desecación (Crowe, Crowe, & Chapman, 1984; Hallsworth & Magan, 1994a; Harman et al., 1991; Jin, Harman, & Taylor, 1991).

Frente a las técnicas de fermentación sumergida, la fermentación en estado sólido presenta las ventajas que se enuncian a continuación (Feng, Liu, & Tzeng, 2002; Hölker & Lenz, 2005; Larroche, Theodore, & Gros, 1992; Pandey, Fernandes, & Larroche, 2008; Thomas, Larroche, & Pandey, 2013):

- Rendimientos volumétricos y productividades más altas.
- Costos más bajos por no demandar un consumo energético asociado a la agitación mecánica.
- Obtención de estructuras de resistencia (conidios o esporas) con mayor tolerancia al secado y otros fenómenos de estrés.
- Mayor economía del proceso al hacer uso de subproductos o residuos agrícolas e industriales como medio de cultivo.

Son numerosos los ejemplos de la aplicación práctica de la fermentación sólida para la obtención de biomasa de microorganismos biocontroladores como *Beauveria bassiana* (Chen et al., 2011; Desgranges, Vergoignan, Léréec, Riba, & Durand, 1993), *Trichoderma harzianum* (Chen et al. 2011) y *Bacillus thuringiensis* (Zhang et al. 2015), mediante el uso de sustratos agroindustriales. En Latinoamérica, la empresa brasilera Farroupilha Lallemand es un ejemplo exitoso a nivel industrial, ya que cuenta con la planta de producción más grande de *T. koningiopsis* para el control de *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Sclerotinia*, y produce bioinsecticidas con base en *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (Leymone, 2016).

Aplicaciones de la fermentación líquida

La fermentación sumergida ha sido utilizada en las últimas décadas como método de producción de bacterias y levaduras, principalmente, debido a su elevada homogeneidad dentro del medio de cultivo y a la facilidad para el control de parámetros de operación tales como temperatura, pH, humedad y oxígeno disuelto (Zhuang, Zhou, Wang, Liu, & Xu, 2011).

En general, para el caso de los hongos filamentosos, la esporulación durante la fermentación líquida suele ser más rápida y más fácil de controlar, pero la

productividad volumétrica de esporas es relativamente baja en comparación con la SSF (Tunga et al., 1998). Sin embargo, existen numerosos estudios que demuestran la aplicabilidad de la fermentación sumergida para la producción de otro tipo de estructuras de resistencia como blastosporas de diversos hongos entomopatógenos, con ventajas comparativas como una mejor tolerancia a procesos de secado y a la radiación ultravioleta. Por ejemplo, para *Isaria fumosorosea* se han obtenido altas concentraciones de blastosporas ($> 1 \times 10^9$ blastosporas/ml) en medios relativamente económicos y con tiempos cortos de fermentación (48 horas), que al ser sometidas a procesos de secado mantuvieron su viabilidad por encima del 86 % y presentaron una vida útil mayor a 14 meses, sin pérdida significativa de virulencia hacia la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Mascarin, Jackson, Kobori, Behle, & Delalibera Júnior, 2015; Jackson Cliquet, & Iten, 2010). En otro trabajo, Chong-Rodríguez, Maldonado-Blanco, Hernández-Escareño, Galán-Wong y Sandoval-Coronado (2011) evaluaron varios medios de cultivo y seleccionaron como fuente de carbono una mezcla de sacarosa con licor de maíz, con la que obtuvieron una concentración de $6{,}38 \times 10^9$ blastosporas/ml del hongo *Beauveria bassiana*. La velocidad de germinación de estas blastosporas no se vio afectada por el proceso de secado por aire forzado; se mantuvieron viables por seis meses, a una temperatura de almacenamiento de 4 °C, además, conservaron su virulencia contra larvas de tercer instar de *Plutella xylostella*, con mortalidades acumuladas del 90 % después de ocho días.

Sin lugar a dudas, el bioplaguicida más exitoso está basado en la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt), que representa aproximadamente un 2 % del mercado total de insecticidas y cerca del 90 % de las ventas de todos los bioplaguicidas a nivel mundial. Su éxito comercial se debe a la habilidad de esta bacteria para producir, mediante procesos de fermentación líquida, grandes cantidades de inclusiones cristalinas que contienen proteínas conocidas como δ-endotoxinas o proteínas Cry. Tales proteínas tienen propiedades insecticidas que son altamente específicas para un amplio rango de insectos plaga (dípteros, lepidópteros y coleópteros) y son inocuas para plantas, animales y la mayoría de insectos no-blanco como abejas, mariquitas y parasitoides (Marvier, McCreedy, Regetz, & Kareiva, 2007).

Actualmente existen diferentes productos a base de Bt que han sido desarrollados para el control de insectos en agricultura y también contra especies de mosquitos de interés en sanidad pública. La mayoría de estos productos están basados en mezclas de esporas y cristales derivadas de cepas nativas como las siguientes: *B. thuringiensis* var. *Kurstaki* (Btk) HD1 (que expresa proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry2Aa) o HD73 (que produce Cry1Ac); *B. thuringiensis* var. *Aizawai* HD137 (que produce toxinas Cry ligeramente diferentes, tales como Cry1Aa, Cry1Ba Cry1Ca y Cry1Da); *B. thuringiensis* var. *San Diego* y *B. thuringiensis* var. *Tenebrionis* (que producen la toxina Cry3Aa); y Bti (que contiene las toxinas Cry4A, Cry4B, Cry11A y Cyt1Aa).

Los productos basados en Btk son efectivos para controlar muchos lepidópteros fitófagos, que son plagas de cultivos importantes o defoliadores en cultivos forestales. Los productos basados en Bt Aizawai son especialmente activos contra larvas de lepidópteros que se alimentan de granos en almacenamiento. Los productos basados en Bt San Diego y Bt Tenebrionis son recomendados para control de escarabajos plaga en agricultura. Finalmente, los productos basados en Bti son usados para el control de mosquitos que son vectores de enfermedades en humanos como el dengue y la malaria (Soberón, Gill, & Bravo, 2009).

La obtención de las mezclas de esporas y cristales en cualquiera de las variedades de *B. thuringiensis* mencionadas arriba requiere del diseño de un medio de cultivo específico para obtener las concentraciones adecuadas para los procesos de separación, formulación y almacenamiento. En los procesos de producción convencionales, los productos de Bt se desarrollan comercialmente en medios de cultivo sintéticos que contienen harina de soya o de pescado, glucosa, extracto de levadura, peptona, elementos traza y, algunas veces, otros ingredientes para incrementar la esporulación. El costo de producción de Bt depende de muchos factores, sin embargo, el costo de las materias primas es uno de los factores más importantes, que puede comprender entre el 30 % y el 40 % del costo total de producción (Ejiofor, 1991). Por tanto, recientemente se ha puesto mayor atención en el diseño de medios de cultivo más eficientes, con ingredientes de bajo costo (leche de soya, melazas, suero, residuos de plumas de pollo y cascarilla de arroz,

entre otros) y mediante la aplicación de herramientas estadísticas de optimización (Alves, Alves, Pereira, & Capalbo, 1997; Poopathi, Kumar, Kabilan, & Sekar, 2002; Paul, Paul, & Khan, 2011). Un buen ejemplo de esto es el trabajo de Hasanain (2017), quien evaluó siete ingredientes locales, todos con características de subproductos de diferentes procesos y, mediante un diseño factorial de 35 tratamientos, seleccionó cactus y agua de mar como los componentes principales de un medio de cultivo complejo, en el que se determinó como variable fisicoquímica clave el control del pH en un valor óptimo de 7,2 para favorecer la producción del complejo espora-cristal de *B. thuringiensis*. Este se usó en África para el control del mosquito *Anopheles*, vector de la malaria.

Otro modelo muy estudiado y exitoso de aplicación de la fermentación sumergida es el de la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens*, rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR, por su sigla en inglés) que presenta características interesantes para el desarrollo de biofertilizantes, bioplaguicidas y otros bioproductos. Esto, debido a que tiene una alta capacidad de colonización rizosférica, forma esporas que le confieren resistencia al secado y facilitan su formulación, produce enzimas industriales —como la α-amilasa y la subtilisina (una proteasa usada en detergentes y limpiadores de lentes de contacto)— y péptidos antibióticos, antibacteriales y antifúngicos (Yu et al., 2002).

En ese sentido, Díaz, García y Zapata-Narváez (2015) estandarizaron en Corpoica las condiciones de fermentación líquida de *B. amyloliquefaciens* Bs006 y optimizaron las concentraciones de microelementos en el medio para inducir altas concentraciones de esporas ($\sim 1 \times 10^{10}$ esporas/ml), con tiempos de fermentación de 60 horas. Estas esporas constituyen el ingrediente activo de un bioplaguicida para el control de *F. oxysporum* en el cultivo de uchuva.

En otros estudios también se ha demostrado la producción mediante la aplicación de procesos de fermentación líquida y de lipopéptidos antifúngicos del tipo iturina, surfactina y fengicina, que tienen el potencial de control de patógenos tales como *Sclerotinia sclerotiorum* (Álvarez et al., 2012), *Ralstonia solanacearum* (Singh, Yadav et al., 2016) y *Phytophthora* blight (Chung & Kim, 2005) en diferentes cultivos de interés comercial.

Formulación

El éxito en campo y la viabilidad económica de los productos para el control biológico depende de varios factores: el efecto sobre la plaga objetivo (fitopatógeno o insecto), el tamaño del mercado, el espectro de plagas afectadas por el agente de biocontrol, la consistencia en el efecto biocontrolador bajo condiciones de campo y los costos de producción. También influyen aspectos tecnológicos como la fermentación, la formulación y el sistema de entrega para que el producto sea fácil de aplicar y que (idealmente) no requiera cadena de frío para su transporte y almacenamiento. Se busca, entonces, que las formulaciones mejoren la estabilidad del producto en el almacenamiento para que este tenga una vida útil superior a un año y para que su eficacia sea consistente en campo cuando el producto se aplique en varios cultivos, contra diversas plagas y en distintas condiciones climáticas.

La formulación de microorganismos biocontroladores es considerada una etapa crucial para garantizar tanto la actividad del agente de biocontrol en condiciones de aplicación comercial como su estabilidad en condiciones de almacenamiento. El lento progreso de la investigación en la formulación de los bioplaguicidas se ha considerado como un obstáculo para el posicionamiento de estos productos. Sin embargo, antes de iniciar el proceso de formulación de un microorganismo, se deben definir varios aspectos tecnológicos que son requisito para este tipo de productos, como el tipo de propágulo que va a constituirse en principio activo del producto. El proceso previo de fermentación en fase sólida, líquida o bifásica debe garantizar que se produzca una alta cantidad de los propágulos (principio activo del futuro bioplaguicida), con óptima actividad biocontroladora y a bajo costo.

Es importante, también, caracterizar tanto el sitio en donde se llevará a cabo la aplicación del bioplaguicida (para determinar las condiciones que lo podrían afectar) como las plantas hospederas en el que este producto se aplicará (cultivo), particularmente, en lo relativo a su arquitectura y fenología. Además, es necesario conocer la biología del patógeno o del insecto plaga por controlar, ya que, de acuerdo con esta información, se debe desarrollar una formulación

que permita llegar a los sitios requeridos para prevenir los daños causados por estos agentes o para interrumpir su ciclo, lo cual facilita la aplicación.

Así mismo, antes de empezar el proceso de formulación, es necesario conocer las características ecofisiológicas del microorganismo biocontrolador, para definir cómo la temperatura, la humedad, el pH, la radiación ultravioleta, la actividad de agua (Aw) y otros factores presentes en las zonas en que se aplicará influyen en la viabilidad y la actividad del agente de control biológico. De esta forma, la formulación estará dirigida a conferirle tolerancia al microorganismo frente a las condiciones adversas, estabilidad en el almacenamiento, facilidad en la aplicación y alta efectividad, todo esto dentro de los parámetros de costo-efectividad. El diseño de una formulación implica dos etapas básicas: preformulación y formulación.

Preformulación

La etapa de preformulación tiene como objetivo recopilar información fisicoquímica relacionada con el ingrediente activo y con los auxiliares de formulación por emplear (Villarreal, 2013; Wells, 2004), ya sea a partir de la bibliografía existente o de pruebas experimentales. En el caso de los bioplaguicidas cuyo ingrediente activo es un microorganismo que debe permanecer vivo y activo biológicamente, la información también debe establecerse con pruebas microbiológicas y biológicas (bioensayos). Esta información permite conocer la morfología y ecofisiología del microorganismo para tener una mayor comprensión de cómo interactuará en el medio de cultivo o en la formulación a desarrollar y qué excipientes o procesos pueden afectarle. La etapa de preformulación incluye las siguientes actividades.

Caracterización del ingrediente activo y de los excipientes

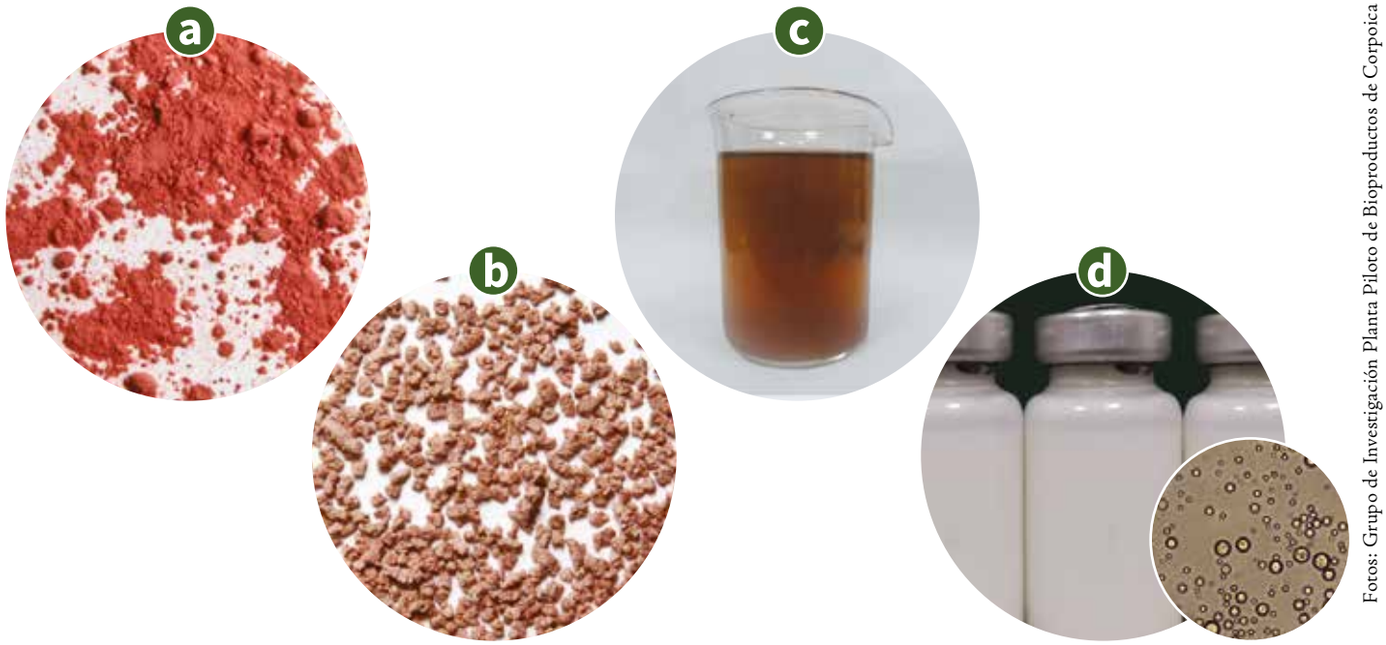
En el caso de que el ingrediente activo sea un microorganismo, se establecen las características del tipo de propágulo que se obtiene a partir del proceso de producción masiva. Los propágulos pueden ser células vegetativas o esporas (en el caso de bacterias), conidios, clamidosporas o micelios (en el caso de mohos), células vegetativas (en el caso de levaduras) o suspensión de células o de virus (en el caso de baculovirus). La caracterización del principio activo comprende la forma, el tamaño y la evaluación de variables como la concentración, el tamaño de partícula y la viabilidad (expresada como porcentaje de germinación, para el caso de los hongos, o como unidades formadoras de colonia, para el caso de las bacterias y las levaduras; mientras que, en el caso de los virus, la viabilidad se expresa casi siempre como eficacia).

En la caracterización del ingrediente activo también se busca establecer su comportamiento frente a los factores que puedan afectar su estabilidad en almacenamiento y en campo, como la temperatura, el pH y la radiación solar. Esto permite, además, tomar decisiones respecto al tipo de auxiliares de formulación que deben utilizarse y las operaciones unitarias que podrían involucrarse en el proceso de manufactura. Por ejemplo, Villamizar et al. (2006) caracterizaron los conidios de *Beauveria bassiana* (Bv056) y de *Paecilomyces fumosoroseus* (Pc013), aislamientos seleccionados para el control de *Bemisia tabaci*, con miras al desarrollo de prototipos de formulación. Para esto, a los conidios obtenidos a partir del sustrato de producción se les determinó su concentración, germinación, humedad y tamaño de partícula.

Por otra parte, para la caracterización de los auxiliares de formulación, se busca conocer sus propiedades físicas y químicas, y se establece también su sensibilidad frente a factores ambientales o posibles interacciones entre los auxiliares mismos o con el principio activo, ya que estas últimas pueden llegar a generar productos de degradación que, con el tiempo, afectarían la estabilidad del producto.

Diseño de los prototipos de formulación

En la primera etapa de preformulación, se define el sistema de entrega del microorganismo, que puede ser polvo para espolvoreo (DP), polvo mojable (WP), polvo para recubrimiento de semillas (DS), gránulos (GR), microgránulos (MG), gránulos dispersables (WG), emulsiones (aceite en agua EW o agua en



Fotos: Grupo de Investigación Planta Piloto de Bioproductos de Corpoica

Figura 12.2. Prototipos de formulación. a. Polvo mojable; b. Gránulos dispersables; c. Suspensión concentrada; d. Emulsión aceite en agua con vista microscópica de las dos fases estabilizadas.

aceite EO), suspensión concentrada (SC), dispersión en aceite (OD), suspoemulsiones (SE), suspensión de microencapsulados (CS), suspensiones la para aplicación a ultrabajo volumen (ULV), etc. (figura 12.2).

Los polvos para espolvoreo, por ejemplo, se aplican principalmente en seco sobre la superficie del suelo o de las plantas. En estos casos, la materia activa se encuentra dispersa en un vehículo inerte sólido que puede estar acompañado con agentes de fluidez y diversos estabilizantes. Los polvos mojables, por su parte, son aquellos que deben reconstituirse en agua para su aplicación; una vez mojados pueden mantenerse en suspensión durante un periodo de tiempo largo. Los granulados son aglomerados de partículas con tamaños que oscilan entre 0,2 y 1,5 mm; contienen el principio activo, un agente aglutinante, los diluentes y otros coadyuvantes. Dentro de las formulaciones líquidas, se destacan los concentrados emulsionables, que constan de un principio activo suspendido en un medio oleoso apropiado, cuya mezcla con agua produce una emulsión estable.

La mayoría de las formulaciones de bioplaguicidas existentes en el mercado para el control de fitopatógenos y de insectos plaga están basadas en formas secas, polvos mojables, granulados o polvos de reconstitución en vehículos oleosos. Sin embargo, hay aún mucho por explorar en materia de desarrollo de nuevas formulaciones adaptadas a los requerimientos del usuario. En todo caso, el tipo de formulación por desarrollar depende principalmente de las características del blanco a controlar (insecto o fitopatógeno) y del cultivo en que se va a aplicar. De esta manera, si se controla un insecto que permanece en el suelo, se podría desarrollar un granulado dispersable para aplicación en *drench*; si, por el contrario, se encuentra sobre las hojas, será preferible una emulsión, suspensión o polvo mojable que tenga buenas características de adherencia.

El hecho de que el microorganismo que constituye el principio activo de un bioplaguicida deba permanecer vivo, pero estable genética y fisiológicamente, obliga a que este deba mantenerse en estado latente durante el almacenamiento y a que se active cuando sea aplicado para ejercer su actividad biocontroladora. Esto puede ser un reto para el formulador, quien debe considerar los requerimientos y susceptibilidades específicas de cada microorganismo. Es importante tener en cuenta que varios de los factores que pueden afectar a un microorganismo positiva o negativamente provienen de la fermentación, ya que, al separar el microorganismo de su sustrato de producción, además de la biomasa microbiana, pueden quedar materiales extraños cuya interacción física con el microorganismo afecte su

viabilidad y la actividad biocontroladora. También las características fisicoquímicas de la formulación pueden interactuar con los auxiliares de formulación.

La mayoría de las formulaciones implica el uso de surfactantes, dispersantes y agentes de suspensión. Los tensioactivos empleados en la formulación, que pueden ser iónicos o aniónicos, sirven para humedecer los sólidos y para prevenir la aglomeración de las partículas. En general, los tensioactivos aniónicos son adsorbidos por la superficie de las partículas y llevan una carga eléctrica, de forma que trabajan a distancia cuando dos partículas se aproximan entre sí para impartir la estabilidad electrostática. Por otra parte, los tensioactivos no iónicos en la superficie de la partícula promueven estabilidad estérica.

Los dispersantes pueden ser polímeros solubles en agua o agentes espesantes necesarios para una formulación estable. Dado su alto peso molecular, actúan principalmente como una barrera física entre las partículas en el medio líquido de dispersión. Los dispersantes, en general, les confieren viscosidad a las suspensiones líquidas en el estado estático (almacenamiento). Frecuentemente, se utilizan mezclas de estos con los tensioactivos para darle estabilidad a la formulación resultante.

Los agentes de suspensión —que juegan un papel esencial en las formulaciones— incluyen arcillas (palygorskita y bentonita) y sílice entre otros. En su mayoría, son minerales inorgánicos añadidos al sistema, representados por partículas finas de 1 a 50 µm, que pueden ser hidrófilos o hidrófobos. Ayudan a separar las partículas para que no se aglomeren, a la vez que modifican la reología y mejoran el flujo del sistema.

Otras presentaciones de bioplaguicidas, como los granulados (G) —que tienen aspecto de arenilla, con tamaños de partícula que oscilan entre 0,2 y 1,5 mm—, además del principio activo y el vehículo, contienen un adherente. Los granulados dispersables en agua (WG), además de los auxiliares de formulación mencionados, contienen dispersantes.

De otra parte, la mayoría de las formulaciones de bioplaguicidas requiere el uso de un protector de luz ultravioleta para evitar daños en el ingrediente activo por radiación solar. Dentro de los adyuvantes que actúan como protectores, se encuentran los filtros solares, como el ácido para-aminobenzoico (PABA), y las pantallas solares, como el óxido de zinc y el dióxido de titanio (Velásquez et al., 1998).

Compatibilidad del ingrediente activo con los excipientes

El objetivo de estos ensayos es seleccionar los excipientes y su concentración, de forma que no tengan un efecto negativo sobre el principio activo. La selección de los excipientes para esta prueba se realiza con base en la función que deben tener en la formulación (tabla 12.1), la disponibilidad para su consecución y su costo. La concentración del excipiente por evaluar varía de acuerdo con sus características y su función dentro de la formulación; dicha concentración generalmente se establece con base en la literatura y en la experticia del formulador. De estas pruebas se deben obtener resultados confiables en el menor tiempo posible, por lo que usualmente se hacen ensayos de almacenamiento (mezclas del principio activo con los excipientes a probar) desde ocho días hasta tres meses a temperaturas mayores a las de refrigeración, con el fin de establecer el efecto sobre el principio activo de manera rápida. Como variable de respuesta, en el caso de los hongos biocontroladores, se evalúa la germinación; en el caso de las bacterias, la viabilidad expresada en unidades formadoras de colonia; y en el caso de los virus, se lleva a cabo un ensayo biológico para determinar la eficacia.

En estas pruebas es necesario resaltar la importancia de los diseños estadísticos experimentales, que pueden reducir el tiempo de la evaluación de acuerdo con el número de tratamientos a evaluar. Algunos de los diseños más utilizados son los siguientes:

1. Mezcla binaria: se mezcla el ingrediente activo con un único excipiente y se evalúan diferentes condiciones que pueden afectar la estabilidad del primero, como temperatura, humedad, luz y oxidación.

2. Diseño factorial $2n$-1: permite la evaluación simultánea del ingrediente activo con n excipientes o mezclas de estos y el análisis estadístico de los resultados facilita la identificación de los efectos y la

Tabla 12.1. Función de los excipientes utilizados en la elaboración de bioplaguicidas

Función del excipiente	Descripción	Tipo de sustancia
Desintegrantes	Facilitan la disgregación en pequeños fragmentos. Así, se produce un aumento de la superficie y una aceleración de la liberación del ingrediente activo.	Almidones, derivados de celulosa, pectina y alginatos
Emulsificantes	Facilitan el proceso de formación de la emulsión durante la fabricación y también su estabilidad durante su vida útil.	Se dividen en cuatro categorías principales de acuerdo con su ionización en soluciones acuosas: aniónicos, no iónicos, catiónicos y anfotéricos. Polisacáridos, ésteres de glicerol, ésteres de sorbitán, polisorbatos y ésteres de celulosa.
Reductores de actividad de agua	Sustancias que reducen la cantidad de agua metabólicamente disponible para ser utilizada por un microorganismo, sin causar su muerte. Además, detienen su crecimiento y reducen su metabolismo, lo que puede otorgarle mayor estabilidad durante el almacenamiento.	Sales o polioles, ya que las sales en agua se disocian y las moléculas de agua libres, disponibles para reacciones químicas, participan en la solvatación de los iones de la sal disuelta. Asimismo, los grupos hidroxilo de los polioles forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua y reducen el número de moléculas de agua libres.
Viscosantes / Adherentes	Aumentan la viscosidad de suspensiones acuosas para brindar mayor homogeneidad y estabilidad. Además, pueden proteger los microorganismos de la desecación y darles mayor adherencia.	Polisacáridos, celulosas hidrosolubles, silicatos hidratados, carbómeros, dióxido de silicio coloidal.
Lubricantes	Disminución del rozamiento al comprimir o del comprimido con la matriz.	Talco siliconado, ácido esteárico y estearatos, estearatos magnésicos y cálcicos.
Reguladores de pH	La función de este excipiente es ajustar y mantener el pH en las condiciones óptimas para el microorganismo.	Sales, ácido y bases conjugados.
Diluentes	Son vehículos inertes que pueden ser líquidos, geles o sólidos.	Agua, arcillas, aceites minerales o vegetales, polímeros.

Fuente: Adaptada de Aulton (2004) y Burges (1998)

selección de excipientes. Sin embargo, la magnitud del número de tratamientos puede llegar a ser una limitante para $n > 4$.

3. Diseño de Plackett Burman: permite la evaluación del efecto de varios excipientes sobre la viabilidad del ingrediente activo (usualmente con *n* equivalente a múltiplos de cuatro), en estas pruebas se puede llevar a cabo la selección del auxiliar de formulación más adecuado para una función específica dentro de la formulación, de acuerdo con las operaciones unitarias involucradas en su manufactura. No presenta la limitación en el número de tratamientos de los diseños factoriales.

Formulación

Una formulación está compuesta por un ingrediente activo (microorganismo, extracto vegetal, metabolito, etc.) que ejerce la actividad biológica y un grupo de auxiliares de formulación o excipientes (sustancias inertes que deben proteger y liberar el ingrediente activo). Estos auxiliares deben asegurar la estabilidad del producto, proteger el principio activo de la radiación ultravioleta, asegurar la permanencia sobre el blanco, retener la humedad, protegerlo de la desecación, promover la dispersión del bioproducto y facilitar su aplicación (Boyetchko et al., 2002; Burges, 1998; Ravensberg, 2011). Por tanto, la primera función de una formulación es mantener el propágulo o microorganismo con baja o ninguna actividad metabólica y, al mismo tiempo, mantenerlo viable y virulento por el mayor tiempo posible de almacenamiento (Ravensberg, 2011).

Con base en la información recopilada en la etapa anterior, se definen los posibles componentes de los prototipos de formulación y se establece una composición semicuantitativa. Para este tipo de decisiones es recomendable usar como herramienta de selección de los prototipos de formulación diseños estadísticos experimentales (Huynh-Ba, 2008). Igualmente, durante esta etapa se elaboran las primeras propuestas para el procedimiento de fabricación, así como los estudios de estabilidad y de eficacia para la selección de la posible formulación. Las pruebas realizadas en esta etapa permiten definir factores relacionados con la composición de la formulación, con el proceso de manufactura, el tipo de envase y los estudios de estabilidad (Aulton, 2004). En la tabla 12.2 se presentan algunos ejemplos de estudios de desarrollo de bioplaguicidas realizados con las etapas de preformulación y formulación.

Desarrollo de bioplaguicidas en Colombia: caso Corpoica

Desde hace 24 años, mediante una estrategia de trabajo multidisciplinario, en Corpoica se ha seguido el esquema de desarrollo de bioplaguicidas definido en la figura 12.1. Este trabajo ha dado como resultado tres productos registrados: dos bioinsecticidas y un biofungicida. Además, ocho bioplaguicidas se encuentran en avanzado estado de desarrollo (tabla 12.3).

Evaluación de la compatibilidad de bioplaguicidas con agroquímicos

Una de las etapas finales en el desarrollo de un bioplaguicida consiste en establecer su compatibilidad con agroquímicos, ya que su incompatibilidad con los insumos usados dentro de las prácticas tradicionales del cultivo es una de las principales limitantes de los productos biológicos empleados en campo (Grijalba et al., 2014). Los agroquímicos comprenden productos de síntesis química de amplio espectro que son usados extensivamente en muchos agroecosistemas y que pueden tener efectos adversos sobre la eficacia de los microorganismos biocontroladores. Los agroquímicos incluyen los fungicidas, que son frecuentemente requeridos para controlar enfermedades de plantas; los insecticidas, que pueden ser necesarios para suprimir una rápida expansión de la población de insectos plaga; y los herbicidas, fertilizantes y reguladores de crecimiento (Karnataka, 2007).

Las pruebas de compatibilidad de bioplaguicidas con agroquímicos tienen como objetivo permitir una adecuada integración del producto desarrollado con otras estrategias de control de plagas, con el fin de obtener un cultivo sano y con la menor perturbación posible del agroecosistema (FAO, 2005), o evitar que un mal uso del bioplaguicida, al mezclarse inadecuadamente con otras sustancias, pierda su eficacia. Solo el uso de los bioplaguicidas dentro de un programa de MIP (que incluya el uso de diferentes métodos de control de insectos plaga y enfermedades) permitirá incrementar la productividad y el rendimiento por unidad de área de los cultivos, disminuir los residuos de insecticidas en los alimentos y promover nuevas alternativas de control ambientalmente sostenible (Marcus, 2009).

Tabla 12.2. Estudios de preformulación y formulación en el desarrollo de bioplaguicidas a base de entomopatógenos

Aislamiento seleccionado	Etapa de preformulación			Etapa de formulación		Referencia
	Caracterización del ingrediente activo	Diseño de prototipos	Compatibilidad con excipientes	Elaboración de prototipos de formulación	Caracterización de prototipos de formulación	
Beauveria bassiana y *Paecilomyces fumosoroseus*	Concentración y germinación Tamaño de partícula de los conidios Susceptibilidad frente a la radiación ultravioleta tipo C	Polvo mojable	• Mezcla binaria, temperatura de almacenamiento entre 8 °C y 28 °C durante dos meses de almacenamiento • La germinación se evalúa cada mes	Composición cuali-cuantitativa de los prototipos y estudio de estabilidad acelererada a 8 °C, 18 °C y 28 °C durante tres meses de almacenamiento	Concentración, germinación, humedad, tamaño de partícula, susceptibilidad a la radiación solar	Villamizar et al. (2006) Grijalba, et al. (2009)
Virus de *Spodoptera frugiperda* SfNPV003	Morfología y tamaño de los cuerpos de inclusión del virus, caracterización molecular y caracterización biológica	Microcápsulas	• Estudio de compatibilidad con solventes utilizados en la elaboración de las microcápsulas • Evaluación de la actividad biocontroladora • Selección de condiciones para el proceso de formación de microcápsulas mediante la metodología de evaporación de solventes (concentración de tensioactivo y del polímero)	Eficiencia del proceso y concentración de las microcápsulas	Tamaño de partícula y morfología • Efecto de la radiación ultravioleta • Estabilidad en almacenamiento a 8 °C, 18 °C y 28 °C durante 15 meses	Barrera et al. (2012) Villamizar et al. (2012)

Fuente: Elaboración propia

Sin embargo, para que un programa de control sea efectivo, todos los métodos combinados (inclusive los agentes de control biológico) necesitan ser compatibles entre sí (Bardin et al., 2008).

Otro aspecto que resalta la importancia de las pruebas de compatibilidad es que al utilizar dosis subletales de agroquímicos en combinación con microorganismos biocontroladores se puede obtener un efecto positivo, de manera que los insectos y fitopatógenos resulten más susceptibles a la acción de las toxinas de los microorganismos. Por ejemplo, Alves et al. (1998) encontraron que algunas combinaciones de insecticidas con hongos entomopatógenos tienen un efecto aditivo, ya que los insecticidas, en una dosis menor a la recomendada, fueron compatibles con el hongo *M. anisopliae* de forma tal que disminuyeron la inmunidad del insecto y permitieron un incremento en la efectividad del entomopatógeno.

Las pruebas de compatibilidad de bioplaguicidas con agroquímicos son específicas, es decir, deben llevarse a cabo con cada formulación o cepa de microorganismo, aun cuando el género sea el mismo, ya que el efecto de un agroquímico sobre un bioplaguicida varía ampliamente de acuerdo con la especie del microorganismo biocontrolador que sea utilizado como ingrediente activo. El efecto también varía según la naturaleza de la molécula química, el tipo de producto, su modo de acción y la dosis del agroquímico (Alves & Lecuona, 1998; Batista Filho et al., 2001; Grijalba Bernal et al., 2014; Pavone & Dorta, 2010). En los ensayos *in vitro* se evalúa el efecto tóxico del agroquímico sobre la viabilidad del microorganismo biocontrolador en condiciones de laboratorio.

Para el caso de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii*, *Metarhizium anisopliae*, *Nomuraea rileyi* e *Isaria fumosorosea*, la compatibilidad se evidencia sobre el crecimiento vegetativo, la esporulación y la germinación. El crecimiento vegetativo se evalúa generalmente por el efecto sobre el crecimiento diametral del hongo, para lo cual se ajusta la concentración del agroquímico en una caja de Petri con un medio de agar y se coloca en el centro un disco del hongo en estado activo. A este último se le mide el crecimiento diametral cada cierto tiempo hasta completar aproximadamente 10 o 12 días.

Algunos autores utilizan un segmento de este mismo hongo para evaluar la esporulación: mediante el método de barrido de la colonia, se prepara una suspensión de conidios que se utiliza para llevar a cabo el recuento en cámara de Neubauer. En cambio, para el caso de la germinación, se prefiere dejar los conidios en contacto directo con una suspensión del agroquímico a evaluar durante un tiempo determinado, el cual pretende simular las condiciones reales de aplicación. Este contacto generalmente no dura más 12 horas, al cabo de las cuales se toma una muestra de la suspensión, cuya germinación es evaluada después de 24 horas de incubación.

Para el caso de hongos antagonistas (como *Trichoderma harzianum*), la compatibilidad con agroquímicos y extractos vegetales usados para el biocontrol de hongos fitopatógenos se evalúa aplicando técnicas analíticas similares a las mencionadas arriba, basadas en el crecimiento fúngico expresado como diámetro de la colonia y crecimiento micelial promedio.

Para el caso de las bacterias y los virus entomopatógenos, estos microorganismos se dejan en contacto con la suspensión del agroquímico a evaluar. La viabilidad de las bacterias es evaluada mediante recuento en placa, mientras que los virus deben ser purificados retirando los residuos de agroquímico y evaluados mediante un ensayo biológico en el cual se determina su actividad biológica.

Para el caso de las bacterias antagonistas (*Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*, por ejemplo), es usual usar la técnica del "agar envenenado". En esta, las dosis de agroquímicos se mezclan con agar fundido usado convencionalmente para el crecimiento de la bacteria y se ubican en cajas de Petri por triplicado. Desde el centro de la caja se siembra masivamente o en forma de rejilla un cultivo bacterial activo y se incuba bajo condiciones óptimas de temperatura. Después de 48 horas, se registra el crecimiento y se compara con un testigo sin adición del agroquímico. Otro método evalúa la interacción directa en un caldo nutritivo inoculado con el microorganismo en el que se adiciona la dosis del agroquímico, se incuba y se cuantifica el crecimiento por un método turbidimétrico. Los resultados se contrastan con un control sin adición del químico.

Tabla 12.3. Bioplaguicidas desarrollados por Corpoica

Principio activo	Características del desarrollo	Efecto	Cultivo	Beneficios	Estado de desarrollo
Trichoderma koningiopsis Th003 Nombre comercial: Tricotec	Producción del microorganismo: fermentación sólida Formulación: polvo mojable (WP) Control de calidad: Concentración mínima 1×10^9 UFC/g, germinación > 80 %	Control de fitopatógenos: *Rhizoctonia solani*, *Pythium splendens*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia minor*, *Botrytis cinerea*, *Oidium lycopersici*, *Sclerotium cepivorum*, *Olpidium virulentus*, *Spongospora subterranea*, *Plasmodiophora brassicae*	Evaluaciones en campo: tomate, arroz, papa, lechuga, cohombro, cebolla, fríjol, habichuela, uchuva, mora Uso potencial: palma, algodón, maíz, flores, soya, cacao, aguacate, otros frutales Control de *Phytophthora* spp., *Moniliophthora roreri* y otras especies de *Fusarium* spp.	• Microorganismo endofítico • Promoción de crecimiento vegetal • Eficacia entre 60 % y 85 % en campo • Reemplazo o reducción en aplicaciones de químicos extremada y altamente tóxicos tales como vitavax, flutolanil, validacin, carbenzazim, benomil, tiabendazol, iprodione y procimidona	Producto registrado para su uso en tomate, lechuga y arroz
Lecanicillium lecanii LV026 Nombre comercial: Lecabiol	Producción del microorganismo: fermentación sólida Formulación: granulado dispersable (WG) Control de calidad: Concentración mínima 5×10^9 UFC/g, germinación > 80 %	Control de insecto plaga: Moscas blancas (*Trialeurodes vaporariorum* y *Bemisia tabaci*)	Evaluaciones en campo: algodón, berenjena, tomate, melón, fríjol y soya Uso potencial: frutales, plátano, papa y control de áfidos, trips, royas y otros patógenos foliares	• Eficacia entre el 50 % y el 80 % en campo • Disminución de la pegajosidad en algodón (aumento de calidad) • Reducción en aplicaciones de químicos como buprofezin, imidacloprid, piriproxifen	Producto registrado para su uso en algodón, soya, tomate, berenjena, pimentón, tomate de árbol, uchuva y ají
PhoGV baculovirus	Producción del microorganismo: *in vivo* Formulación: polvo para espolvoreo Control de calidad: Concentración mínima 5×10^6 CI/g	Control de insecto plaga: *Tecia solanivora* (polilla guatemalteca de la papa)	Papa en almacenamiento	• Eficacia superior al 80 % • Dosis de 2,5 kg/t papa • Categoría toxicológica: IV • Reducción en aplicaciones de químicos como fosfamina	Producto registrado para papa en almacenamiento y papa de consumo

(Continúa)

(Continuación tabla 12.3)

Principio activo	Características del desarrollo	Efecto	Cultivo	Beneficios	Estado de desarrollo
Isaria fumosorosea	Producción del microorganismo: fermentación sólida Formulación: granulado dispersable	Control de insecto plaga: Moscas blancas (*Trialeurodes vaporariorum* y *Bemisia tabaci*)	Evaluaciones en campo: algodón, berenjena, tomate, melón. Usos potenciales: control de áfidos, trips, *Diaphorina citri*, nemátodos, royas y otros patógenos foliares	• Disminución de la pegajosidad en algodón (aumento de calidad) • Reducción en aplicaciones de químicos como buprofezin, imidacloprid, piriproxifen	Producto en fase de desarrollo
Rhodotorula glutinis	Producción del microorganismo: fermentación líquida Formulación: suspensión concentrada	Control de *Botrytis cinerea* en precosecha Control de patógenos de poscosecha: *Botrytis cinerea*, *Penicillium* spp., *Rhizopus stolonifer*	Mora Usos potenciales: flores, fresa, banano, cítricos, otras frutas, cacao	Reducción en aplicaciones de químicos en precosecha y menores pérdidas en poscosecha	Producto en fase de desarrollo
Metarhizium rileyi	Producción del microorganismo: fermentación sólida Formulación: suspensión oleosa concentrada Control de calidad: Concentraciónmínima 1×10^9 CI/g	Control de insecto plaga: *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero)	Evaluaciones en invernadero: maíz Usos potenciales: algodón, sorgo, soja, girasol, pastos, arroz Otros: noctuidos	Reducción en aplicaciones de químicos como lufenuron, cipermetrina y clofuazuron	Producto en proceso de desarrollo
Metarhizium anisopliae	Producción del microorganismo: fermentación sólida Formulación: polvo mojable Control de calidad: Concentración mínima 1×10^9 CI/g	Control de insecto plaga: *Rhammatocerus schistocercoides* (langosta llanera) y chizas	Evaluaciones en campo: pastos Usos potenciales: mion de los pastos y de la caña, picudo y crisomélidos	Reducción en aplicaciones de químicos como furadan, abamectina y permetrina	Producto en proceso de registro

(Continúa)

(Continuación tabla 12.3)

Principio activo	Características del desarrollo	Efecto	Cultivo	Beneficios	Estado de desarrollo
Beauveria bassiana	Producción del microorganismo: fermentación sólida Formulación: granulado para espolvoreo	Control de insecto plaga: *Premnotrypes vorax* (gusano blanco)	Evaluaciones en campo: papa Usos potenciales: control de áfidos, moscas blancas, broca del café, crisomélidos, picudo y trips	Reducción en aplicaciones de químicos como furadan y abamectina	Producto en fase de desarrollo
Beauveria bassiana	Producción del microorganismo: fermentación sólida Formulación: suspensión oleosa concentrada	Control de insecto plaga: *Diatrea saccharalis*	Evaluaciones en campo: caña panelera Usos potenciales: caña azucarera, arroz, maíz y sorgo Control de áfidos, moscas blancas, broca del café, crisomélidos, picudo y trips	Eficacia superior al 70 % en caña panelera	Producto en fase de desarrollo
Nucleopoliedrovirus SfNPV Nombre comercial: Spobiol	Producción del microorganismo: *in vivo* Formulación: polvo mojable (WP) Control de calidad: Concentración mínima 1×10^9 CI/g	Control de insecto plaga: *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero)	Evaluaciones en campo: maíz Uso potencial: algodón, sorgo, soja, girasol, pastos y arroz	• Eficacia superior al 70 % • Reducción en aplicaciones de químicos como lufenuron, cipermetrina y clofuazuron	Producto registrado en maíz

(Continúa)

(Continuación tabla 12.3)

Principio activo	Características del desarrollo	Efecto	Cultivo	Beneficios	Estado de desarrollo
Granulovirus *Erinnyis ello* Nombre comercial: Erytec	Producción del microorganismo: *in vivo* Formulación: polvo mojable (WP) Control de calidad: concentración mínima 1×10^9 CI/g	Control de insecto plaga: *Erinnyis ello* (gusano cachón)	Evaluaciones en campo: caucho Uso potencial: yuca y papaya	• Eficacia superior al 80 % en caucho • Tiempo de acción de tres días	Producto en proceso de registro en caucho
Granulovirus *Tuta absoluta*	Producción del microorganismo: *in vivo* Formulación: polvo mojable (WP)	Control de insecto plaga: *Tuta absoluta* (gusano minador)	Evaluaciones en invernadero: tomate Uso potencial: *Phthorimaea operculella* en papa y tomate	Eficacia superior al 60 % en invernadero	Producto en fase de desarrollo

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 12.4 se presentan algunos ejemplos de trabajos encontrados en la literatura entre 2000 y 2017. Predominan los trabajos realizados con hongos entomopatógenos y antagonistas y con bacterias antagonistas, independientemente de que el microorganismo con actividad biológica se encuentre formulado o no. Sobre bacterias y virus entomopatógenos se encontró la menor cantidad de información.

Tabla 12.4. Trabajos registrados en la literatura en los que se evalúa la compatibilidad de un microorganismo biocontrolador con agroquímicos

Microorganismo	Agroquímicos evaluados	Dosis evaluada	Variables evaluadas	Autor y año
Beauveria bassiana y *Verticillium lecanii*	Insecticidas, fungicidas y fertilizantes	Dosis recomendada (DR)	Germinación de conidios	Dutta et al. (2016)
Beauveria bassiana y *Metarhizium anisopliae*	Herbicidas, insecticidas y fungicidas	0,5 (DR) y 0,25 (DR)	Crecimiento diametral y esporulación	Melo et al. (2015)
Isaria fumosorosea	Fungicidas e insecticidas	(DR): 0,5 (DR) y 0,25 (DR)	Germinación y unidades formadoras de colonia	Grijalba Bernal, Gómez Álvarez y Zuluaga Mogollón (2014)
Nucleopoliedrovirus	Insecticidas y fungicidas	2 (DR)	Actividad biológica sobre larvas de *S. frugiperda*	Santos et al. (2014)
Beauveria bassiana	Insecticidas	0,5 (DR), 1,5 (DR) y 2 (DR)	Crecimiento radial, producción de conidios y germinación de conidios	Ribeiro et al. (2012
Metarhizium anisopliae	Insecticidas químicos y un extracto natural	0,32; 1,6; 8,0; 40; y 200 ppm	Germinación, crecimiento diametral y esporulación	Schumacher y Poehling (2012)
Nomuraea rileyi	Insecticidas, fungicidas y herbicidas	(DR)	Presencia o ausencia de un halo de inhibición en el crecimiento del hongo	Pavone y Dorta (2010)
Metarhizium anisopliae	Fungicidas	(DR)	Germinación y crecimiento diametral	Bruck (2009)
Metarhizium anisopliae	Fungicidas, insecticidas y herbicidas	(DR)	Crecimiento diametral y tasa de esporulación	Karnakata (2007)
Lecanicillium muscarium	Insecticidas	(DR)	Germinación de conidios	Cuthberson, Walters y Deppe (2005)

(Continúa)

(Continuación tabla 12.4)

Microorganismo	Agroquímicos evaluados	Dosis evaluada	Variables evaluadas	Autor y año
Metarhizium anisopliae	Fungicidas e insecticidas	(DR), 0,2; 2,0; 20 y 200 mg/(ia) Kg	Crecimiento diametral	Samson, Milner, Sander y Bullard (2005)
Paecilomyces fumosoroseus	Fungicidas e insecticidas	(DR): 1/10 (DR) y 10 (DR)	Crecimiento radial y germinación de conidios	Kubilay y Gökce (2004)
Beauveria bassiana	Insecticidas	(DR): 0,5 (DR) y 2,0 (DR)	Germinación, crecimiento diametral y esporulación	Oliveira, Oliveira y Sueki (2003)
Aschersonia aleyrodis, *Bacillus thuringiensis*, baculovirus anticarsia (VPNAg), *Beauveria bassiana*, *Hirsutella thompsonii*, *Metarhizium anisopliae*, *Nomuraea rileyi*, *Paecilomyces farinosus*, *Sporothrix insectorum*, *Verticillium lecanii*	Insecticida	Mínima y máxima dosis recomendada	Hongos: crecimiento radial y esporulación Bacterias: unidades formadoras de colonia Virus: actividad biológica en invernadero sobre larvas de *Anticarsia gemmatalis*	Batista et al. (2001)
Beauveria bassiana, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces* sp.	Insecticida	(DR): 0,7 (DR) y 1,3 (DR)	Germinación de conidios, crecimiento diametral y esporulación	Neves, Hirose, Chujo y Moino (2001)
Trichoderma harzianum	Fungicidas, insecticidas, herbicidas y extractos botánicos	(DR)	Crecimiento diametral	Bagwan (2010)
Pseudomonas fluorescens	Fungicidas, insecticidas y herbicidas	(DR)	Crecimiento expresado como diámetro del cultivo	Surendran, Kannan, Nayar y Leenakumary (2012)
Trichoderma viride y *Pseudomonas fluorescens*	Insecticidas, fungicidas, fertilizantes	(DR)	Hongo: crecimiento diametral Bacteria: crecimiento expresado mediante una escala de puntuación (Vidhya et al., 2012)	Dhanya, Anjumol, Murugan y Deepthy (2016)

Fuente: Elaboración propia

No hay una única fórmula que estime el efecto que los agroquímicos pueden tener sobre un microorganismo biocontrolador. En la literatura, los resultados sobre los hongos se han expresado con diferentes índices que integran las variables evaluadas. Algunos de los más citados por diferentes autores son los siguientes:

1. Kumar y Ramya (2014) lo expresaron como porcentaje de inhibición celular (IM) para *Paecilomyces lilacinus:*

   $IM = CCT - CCF/CCT \times 100\,\%$,

   Donde CCT es la variable del tratamiento testigo y CCF es la variable con el agroquímico evaluado (Uribe, 2015).

2. Santos et al. (2013) evaluaron el efecto de los agroquímicos sobre la germinación y la viabilidad de *Lecanicillium lecanii*, y lo expresaron como concentración inhibitoria (CI_{10}), definida como la concentración del agroquímico que reduce la germinación del hongo en un 10 %; para esto se realizó un análisis de regresión lineal en el que se correlacionaron las concentraciones evaluadas para cada agroquímico.

3. Reyes et al. (2012) evaluaron el efecto de agroquímicos sobre el crecimiento diametral de *Trichoderma asperellum* y lo expresaron con la siguiente escala de clasificación: 1 significa compatible e indica que se presenta un efecto de menos del 10 % sobre el crecimiento del micelio; 2 es moderadamente compatible e indica un efecto entre el 10 % y el 30 % sobre el crecimiento del micelio; y 3 es no compatible, con un efecto mayor al 30 % sobre el crecimiento del micelio.

4. Con el mismo propósito de clasificación, Rossi-Zalaf et al. (2008) propusieron una fórmula en la cual, además del crecimiento vegetativo y la esporulación, se tiene en cuenta la germinación de los conidios tanto de *Metarhizium anisopliae* como de *Beauveria bassiana*. La compatibilidad, denominada como índice biológico (IB), fue descrita así:

   $IB = \{(47 \times VG + 43 \times SP + 10 \times GER)/100\}$

   Donde VG es el porcentaje de crecimiento vegetativo de la colonia en relación con el tratamiento control, SP es el porcentaje de esporulación de la colonia con respecto al control y GER es el porcentaje de germinación de los conidios también con relación al control. Valores de 0 a 41 indican que el producto es tóxico, de 42 a 66 es moderadamente tóxico y mayor de 66 es compatible.

5. Con el fin de integrar las diferentes variables evaluadas, Alves y Leucona (1998) propusieron una fórmula para establecer la clasificación de toxicidad de los agroquímicos con los hongos entomopatógenos (T), la cual también podría ser aplicada a los microorganismos biocontroladores de fitopatógenos. En esta fórmula se relacionó el crecimiento vegetativo y la esporulación con el tratamiento control:

   $T = \{(20 \times VG + 80 \times SP)/100\}$

Al respecto, en los trabajos de Neves et al. (2001) se propuso el siguiente rango para clasificar los agroquímicos en función de su toxicidad: valores de 0 a 30 indican que el producto evaluado es muy tóxico, de 31 a 45 es tóxico, de 46 a 60 es moderadamente tóxico, y mayor a 60 es compatible.

En los ensayos *in vivo* que se realizan en condiciones de invernadero o campo, generalmente se hace la aplicación del bioplaguicida o del agente de control biológico sobre las plantas del cultivo que se quiere proteger de determinado insecto o patógeno, y después se aplica el agroquímico que se desea evaluar (Islam & Omar, 2012). Al cabo de 24, 48 o 72 horas, se toman muestras de las hojas y se lavan para recuperar el microorganismo y evaluar, como variable-respuesta, el número de unidades formadoras de colonia (UFC) mediante recuento en placa. Para algunos bioplaguicidas comerciales, se cuenta con información acerca de la compatibilidad biológica y física de las formulaciones con diferentes fungicidas, insecticidas, herbicidas y fertilizantes líquidos. Sin embargo, generalmente estos resultados son producto de ensayos de compatibilidad *in vitro*, realizados en los tanques de mezcla con las metodologías descritas previamente, por tanto, es usual que sea responsabilidad del usuario llevar a cabo una prueba de tolerancia del bioplaguicida para evaluar la fitotoxicidad y residualidad de la mezcla sobre un determinado cultivo cuando se hacen las combinaciones por primera vez.

Hay diferentes opiniones respecto a qué tanto los ensayos *in vitro* pueden asemejar los resultados que se obtienen *in vivo*. Batista et al. (2001) evaluaron el efecto del insecticida Tiametoxam sobre varios microorganismos entomopatógenos, y encontraron que los resultados obtenidos *in vivo* (en campo) confirmaban los resultados obtenidos *in vitro* cuando se hacía la clasificación de toxicidad. Sus resultados sugirieron que la aplicación de Tiametoxam no interfería con inóculos de *B. thuringiensis*, *B. bassiana* y *M. anisopliae*. No obstante, otros estudios registran que los ensayos *in vitro* tienen un mayor impacto negativo sobre los microorganismos en comparación con los ensayos *in vivo*.

Dada la importancia de los estudios de compatibilidad para la adecuada implementación de programas de manejo integrado de plagas, se hace necesario estandarizar a nivel nacional e internacional la metodología utilizada en estos ensayos en condiciones *in vitro* e *in vivo*. También es necesario estandarizar la forma de expresar sus efectos, con el fin de obtener resultados de calidad, que tengan credibilidad y fortalezcan, así, las recomendaciones de uso de los bioplaguicidas a base de microorganismos entomopatógenos.

Control de calidad de bioplaguicidas

Uno de los aspectos cruciales para la aceptación, adopción y comercialización de agentes de control biológico (ACB) es la implementación de un sistema de control de calidad que permita asegurar la máxima eficacia en campo y cumplir con los requerimientos del agricultor (Jenkins & Grzywacz, 2000).

Unas especificaciones del producto bien definidas, respaldadas por procedimientos de control de calidad, ayudan a reducir los costos de manufactura, a maximizar los rendimientos, a certificar la seguridad del producto y a reducir los riesgos por fallas, lo cual genera la confianza de los usuarios (Ravensberg, 2011). Un proceso de producción que no implemente un sistema de calidad es un proceso no controlado, que posiblemente dará lugar a lotes de bioplaguicidas con concentraciones de agente activo variable y de calidad deficiente. Esto se traduce en bioproductos de bajos rendimientos y en la pérdida de credibilidad por parte de los agricultores (Jenkins & Grzywacz, 2000; Kumar et al., 2014). El estricto control de calidad es esencial para generar respetabilidad, confiabilidad y seguridad en el bioplaguicida. Por esta razón, la implementación de un sistema de control de calidad debe incluirse desde el inicio de la producción hasta la obtención del producto final (Gaugler et al., 2000; Jenkins & Grzywacz, 2000; Muñiz-Paredes et al., 2017; Ravensberg, 2011).

Diferentes autores han descrito la importancia del control de calidad. Burges, (1998), por ejemplo, identifica como dos aspectos importantes la identidad del agente biológico y el nivel de contaminantes. Jenkins y Grzywacz (2000) establecieron la necesidad de procedimientos de control de calidad físicos y microbiológicos para agentes fúngicos y virales, tanto en la producción como en los productos finales. Sin embargo, la mayoría de los requerimientos implementados de control de calidad para formulaciones a base de bacterias, hongos y virus se restringen a los solicitados por los entes de control (Arora, Mehnaz, & Balestrini, 2016).

En Colombia, el ente regulador para producir, importar o evaluar bioproductos es el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), entidad que genera los requisitos de control de calidad para los bioplaguicidas. Entre dichos requisitos se incluyen los siguientes: contar con un laboratorio de control de calidad registrado (nacional o internacional), que respalde los resultados de estabilidad del producto; presentar un plan de análisis del control de calidad de muestras por lote, y contar con un procedimiento documentado de muestreo y control de calidad de la cepa usada como ingrediente activo del bioinsumo (Resolución 000698, 2011). El alcance de las técnicas y procedimientos a aplicar depende del ingrediente activo del bioproducto; es responsabilidad del productor su adecuada selección, implementación y análisis. A continuación, se describen los requerimientos de control de calidad de bioplaguicidas.

Identificación del agente biocontrolador

El agente de control biológico utilizado debe ser correctamente identificado de forma macroscópica,

microscópica y por medio de análisis moleculares. De esta manera se asegura que el agente utilizado sea el mismo para todo el proceso de producción. Generalmente, esta identificación se hace al principio del desarrollo del producto (desde la prueba de concepto) y no como parte del procedimiento de control de calidad de cada lote. Sin embargo, el principio activo siempre debe ser controlado visualmente en cuanto a deformaciones u otras desviaciones (cambios genéticos o fenotípicos), para asegurarse de que el organismo utilizado mantenga sus características especiales (Ravensberg, 2011).

Concentración y viabilidad del agente biocontrolador

La concentración es la cantidad del agente biocontrolador existente en un producto formulado. Esta información es fundamental para la aplicación del producto en campo, razón por la cual debe especificarse en la etiqueta (Gómez, Guevara, Cuartas, Espinel, & Villamizar, 2013). El recuento del principio activo puede hacerse dependiendo del tipo de microorganismo y del tipo de formulación. Sin embargo, la concentración no refleja necesariamente la viabilidad y la virulencia del agente de control biológico (Santos et al., 2012).

En el caso de productos a base de hongos y bacterias, es necesario determinar la viabilidad mediante pruebas de germinación o recuento en placa para establecer el número de unidades formadoras de colonia (UFC). En el caso de productos a base de virus, dadas las dificultades para distinguir estos de las partículas de la formulación (o incluso en los casos en que se pueden contar, como los nucleopoliedrovirus), no se pueden diferenciar las partículas viables de las no viables, por lo que se necesita de un bioensayo para evaluar la actividad biocontroladora del producto (Jenkins & Grzywacz, 2000; Ravensberg, 2011).

Contenido de contaminantes (pureza)

La pureza se define por el número total o el porcentaje de contaminantes microbianos (bacterias, mohos y levaduras) en un lote de bioplaguicida. Esta característica puede influir negativamente en la calidad del producto en términos de su vida útil, eficacia e incluso características fisicoquímicas. Además, los contaminantes pueden ser un riesgo para el agricultor y el consumidor. Por lo tanto, el número total de contaminantes no debe superar un cierto límite o porcentaje respecto del ingrediente activo. La norma depende de lo que decida la empresa productora y de lo que exijan los requisitos de registro (Ravensberg, 2011).

La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, por su sigla en inglés) insiste en la ausencia de microorganismos patógenos como *Salmonella* sp., *Shigella* sp. y *Vibrio* spp. en el producto terminado, sin embargo, son muy pocos los laboratorios que realizan este tipo de análisis en bioproductos, lo que en algunas ocasiones trae como consecuencia la no implementación de estos (Jenkins & Grzywacz, 2000). Las especificaciones para determinar un nivel aceptable de contaminantes en un producto final dependen en gran medida de los métodos de producción masiva, fermentación, formulación y empaque. El punto más crítico de posible contaminación es la etapa de producción masiva, debido a que los contaminantes, ya sean hongos o bacterias, pueden crecer rápidamente sin ningún tipo de restricción. Además, es necesario tener en cuenta que los procesos de formulación de productos microbianos generalmente no se realizan en condiciones de esterilidad, por lo que es inevitable la contaminación en este punto de la cadena de producción (Jenkins & Grzywacz, 2000; Jenkins et al., 1998; Kumar et al., 2014). En Colombia, es requisito obligatorio que cualquier bioproducto comercializado deba tener una pureza $\geq 95\,\%$ y que no contenga microorganismos contaminantes ni patógenos a humanos, plantas y animales (Resolución 000698, 2011).

Los niveles de contaminación de bioproductos pueden ser cuantificados usando la técnica de recuento en placa y con los medios de cultivo apropiados para la detección de bacterias y hongos. Esta metodología provee un nivel de contaminantes expresado en UFC por mL o g de producto terminado. Con el fin de estandarizar el proceso de producción del microorganismo biocontrolador, es necesario determinar los niveles de aceptabilidad de contaminación de microorganismos durante la producción, formulación y empaque del

producto. Sin embargo, para asegurar el rendimiento del bioproducto y la aceptación en el mercado, es necesario estandarizar su eficacia. Si un producto presenta una alta viabilidad y virulencia/patogenicidad, su eficacia es la deseada (Jenkins & Grzywacz, 2000).

Características fisicoquímicas

El control de calidad fisicoquímico permite establecer si el bioplaguicida cumple con las especificaciones que garanticen su calidad, estabilidad y eficacia durante procesos de almacenamiento, embalaje, transporte y aplicación.

Para cada tipo de formulación existen características particulares que deben comprobarse y evaluarse. Estas pruebas están basadas en reacciones químicas y fenómenos físicos que ponen de manifiesto características de los diferentes tipos de formulaciones. Para plaguicidas en general, los protocolos aprobados internacionalmente por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) son elaborados por entidades como el Consejo Internacional para la Colaboración en los Análisis de Plaguicidas (Cipac) y la Asociación Internacional de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC). Con respecto a esto, en Colombia se exige una prueba de estabilidad del bioproducto realizada por un laboratorio registrado en el ICA, que contenga la evaluación de al menos dos lotes (cada uno al tiempo cero y al final del periodo de vigencia) y que incluya determinaciones físicas o químicas como pH, densidad, humedad, granulometría y otras que correspondan a la naturaleza y tipo de formulación del producto (Resolución 000698, 2011).

Eficacia

La eficacia determinada mediante bioensayos es la herramienta de mayor importancia en el control de calidad durante la producción de bioplaguicidas. Los valores de virulencia o patogenicidad que se obtengan con estas pruebas deberán estar dentro de los límites previamente establecidos por los productores durante su manufactura (Jenkins & Grzywacz, 2000). En las siguientes páginas se detallan los conceptos y metodologías asociados a los estudios de eficacia para bioplaguicidas.

Estabilidad de bioplaguicidas en condiciones de almacenamiento

La estabilidad de un bioplaguicida bajo condiciones de almacenamiento es uno de los requisitos principales para su registro y comercialización. La estabilidad depende de factores externos (temperatura, humedad relativa y tipo de empaque utilizado) y de factores intrínsecos (características de la cepa, sistema de producción y tipo de formulación), todos los cuales determinan el tiempo durante el cual se conserva la actividad biocontroladora del producto (Santos et al., 2012). A dicho tiempo se le denomina *vida útil* y se determina experimentalmente con base en la evaluación de las características del producto a través del tiempo, en diferentes condiciones de almacenamiento y de acuerdo con el ajuste de los resultados a modelos matemáticos que interpretan el comportamiento (Bruckner, Albrecht, Petersen, & Kreyenschmidt, 2013; Kinay & Yildiz, 2008).

Durante el almacenamiento, los microorganismos pueden sufrir alteraciones debido a factores del proceso de manufactura del producto, como el medio de cultivo, el proceso de separación y secado y la utilización de agentes protectores de secado (Abadias, Usall, Teixidó, & Viñas, 2003). Sin embargo, dependiendo del microorganismo biocontrolador, existen diferentes problemas durante el almacenamiento. Por ejemplo, Elzein, Kroschel y Müller-stöver (2004) sugirieron que la estabilidad de un producto puede ser prolongada si se utilizan las estructuras de resistencia de los hongos como principio activo, ya que estas tienen una estabilidad inherente para su formulación.

Factores ambientales como la temperatura, la humedad relativa y los sistemas de empaque pueden afectar la viabilidad y actividad del agente biocontrolador (Hynes & Boyetchko, 2006). La humedad relativa y el control de la actividad de agua son importantes en el almacenamiento de microorganismos (Faria, Hotchkiss, Hajek, & Wraight, 2010). Muchas investigaciones han reportado que la longevidad de los conidios de hongos formulados aumenta en humedades relativas bajas (Friesen, Holloway, Hill,

& Pugsley, 2006). Por ejemplo, el hongo *Alternaria alternata*, en una formulación almacenada durante 24 meses con una humedad relativa del 12 % y del 75 %, presentó una mayor longevidad de los conidios en la humedad relativa del 12 % (Leland, Mullins, Vaughan, & Warren, 2005).

La temperatura también juega un papel importante en la estabilidad de una formulación, ya que para cada microorganismo hay una temperatura óptima y unos límites diferentes. En algunas ocasiones, las bajas temperaturas detienen el crecimiento del microorganismo, pero mantienen su actividad biocontroladora (Yadav & Chandra, 2014). Por el contrario, las temperaturas altas pueden inactivar los microorganismos biocontroladores si estos no son protegidos, además, pueden afectar también los aditivos de la formulación (Lacey, Headrick, & Arthurs 2008; Pavone, Díaz, Trujillo, & Dorta, 2009; Santos et al., 2012). Generalmente, entre más prolongada sea la exposición a altas temperaturas, mayor es el efecto negativo sobre la formulación, por tal razón es recomendable seleccionar microorganismos que presenten un alto rango de tolerancia a diferentes temperaturas (Copping, 2009; Ravensberg, 2011). Santos et al. (2012), por ejemplo, encontraron que para dos prototipos de formulación a base de *T. koningiopsis* Th003 y *T. asperellum* Th034, los mayores tiempos de vida útil se presentaron en bajas temperaturas de almacenamiento (8 °C y 18 °C) con valores entre 10,8 y 14,4 meses. En contraste, con una temperatura de 28 °C, el rango de vida útil estuvo entre 2,9 y 5,2 meses.

De acuerdo con lo anterior, la estabilidad durante el almacenamiento depende de una adecuada formulación, la cual debe mantener la viabilidad y la actividad del agente biocontrolador durante el mayor tiempo posible, con el fin de disminuir los costos de producción y comercialización.

Estudios de eficacia

Un bioplaguicida microbiano está constituido por uno o varios microorganismos, y cada uno de ellos ejerce múltiples modos de acción, expresados sucesivamente, simultáneamente o sinérgicamente, los cuales en gran medida dependen de las condiciones ambientales. Por ejemplo, *Bacillus subtilis* controla enfermedades de plantas mediante la acción combinada de los metabolitos antimicrobianos (Romero et al., 2007) y la competencia por espacio y nutrientes con los patógenos de la rizosfera (Huang et al., 2014). En el caso de los baculovirus, estos matan a los insectos plaga aprovechando procesos metabólicos del insecto huésped que les permiten su multiplicación. Esta forma de acción implica que el virus esté activo, replicante y que, en la interacción con el insecto, se produzcan varias enzimas y proteínas que conduzcan a la infección y muerte de los insectos (Rohrmann, 2013). Por lo tanto, la química y la bioquímica relacionadas con los modos de acción desempeñan un papel indispensable en el funcionamiento de los bioplaguicidas, lo cual implica que la eficacia de un microorganismo biocontrolador esté estrechamente relacionada con que este encuentre las condiciones adecuadas para ejercer su efecto.

Es importante resaltar que en campo los biocontroladores frecuentemente ejercen una eficacia inconsistente que suele atribuirse a las variaciones climáticas (temperatura, humedad y radiación ultravioleta), a la falta de competencia ecológica (supervivencia y capacidad de colonización) del agente de biocontrol, a los rasgos intrínsecos del microorganismo biocontrolador (producción variable de los metabolitos requeridos o enzimas), a la calidad inestable del producto formulado (Elad & Stewart, 2007; Mark et al., 2006; Ruocco et al., 2011) y a la diversidad en la sensibilidad de los patógenos o de los insectos plaga. Por lo tanto, gran parte del efecto que se tenga en campo dependerá de la calidad de la formulación para brindarle al microorganismo condiciones que favorezcan su supervivencia y actividad.

De acuerdo con la norma EPPO PP1/214 (European and Mediterranean Plant Protection Organization [EPPO], 2014), la eficacia es el resultado neto de los efectos positivos y negativos de la aplicación de un producto. Dicha eficacia debe ser tal que genere un beneficio agrícola que justifique su uso, de forma que se cumpla con las reivindicaciones del producto. Las evaluaciones de eficacia deben desarrollarse según los principios de buenas prácticas experimentales (EPPO, 2017), para garantizar que los ensayos se hagan conforme a altos estándares de calidad y que los resultados derivados de ellos sean comparables y fiables.

Los estudios de eficacia pueden ser de dos tipos: los preliminares, que generan información útil durante el proceso de desarrollo de bioplaguicidas, y los ensayos de eficacia supervisados por la entidad competente con miras a la obtención del registro del producto. En el primer caso, estos se clasifican como ensayos piloto, semicomerciales o de escala comercial.

Ensayos preliminares de eficacia

Los ensayos piloto se usan para evaluar diferentes prototipos de formulación o métodos de aplicación, así como para determinar las consecuencias que ejercen las modificaciones en el proceso tecnológico de producción de un bioplaguicida sobre su eficacia. Entre dichas modificaciones se encuentran, por ejemplo, los cambios en el medio de cultivo o en el sistema de producción masiva del microorganismo, los cambios en la separación del principio activo o en su formulación. Por lo general, los ensayos piloto proporcionan orientación para el desarrollo del producto y permiten generar las recomendaciones para su uso, pero resultan insuficientes para fines de registro. Estos ensayos pueden realizarse en condiciones de semicampo, por ejemplo, al aire libre, pero con ambiente protegido o en jaulas, de forma tal que se asegure la presencia del fitopatógeno o el insecto plaga para producir el efecto deseado.

Los estudios semicomerciales usualmente se llevan a cabo con el producto formulado final, el cual debe aplicarse según las instrucciones propuestas en la etiqueta. A menudo son ensayos en campo repetidos en pequeña escala. Estos proporcionan una evidencia valiosa para realizar las pruebas de eficacia posteriores, además de proporcionar datos para la realización de ensayos a escala comercial (parcelas demostrativas). Los ensayos deben ser desarrollados por el productor con los equipos comercialmente disponibles y las prácticas agronómicas recomendadas para el cultivo. Por esta razón, antes de su realización, es necesario registrar todas las prácticas disponibles y hacer estudios de compatibilidad con los agroquímicos o bioinsumos a utilizar, de forma que se puedan hacer todas las recomendaciones para el uso del bioplaguicida.

Debido a que los ensayos a escala comercial rara vez se replican a causa de su dimensión y costo, los resultados obtenidos son solo indicativos para su aplicación práctica. Estos ensayos deben realizarse únicamente en cultivos con una historia conocida de infestación por parte de insectos plaga o incidencia de enfermedades objetivo del control. Las condiciones culturales (por ejemplo, el tipo de suelo, el pH, los fertilizantes, la labranza, las distancias de siembra, etc.) deben ser uniformes para todas las parcelas del ensayo y cumplir con las prácticas agrícolas locales.

Ensayos de eficacia con fines de registro

El principal objetivo de la evaluación de eficacia con fines de registro de un bioplaguicida es el de determinar los beneficios que se derivan de su uso en la dosis mínima recomendada para definir sus condiciones de uso. Estos ensayos permiten garantizar que las reivindicaciones propuestas para el bioplaguicida y las recomendaciones de uso en la etiqueta están respaldadas por datos comprobados, lo cual significa un beneficio para los usuarios.

Los efectos positivos del bioplaguicida pueden expresarse en términos de 1) reducción de un insecto plaga o del desarrollo de una enfermedad, 2) reducción de los daños en los cultivos, 3) protección o aumento de los rendimientos de los cultivos, 4) mejora de la calidad de los cultivos o 5) protección de los productos en poscosecha.

Los efectos negativos de un bioplaguicida en un cultivo pueden incluir la fitotoxicidad del cultivo objetivo o de los cultivos adyacentes, la reducción del rendimiento, los efectos nocivos sobre los cultivos posteriores, los efectos adversos sobre los polinizadores o sobre los enemigos naturales, el desarrollo de resistencia u otros efectos que puedan reducir la sostenibilidad del sistema de producción. Finalmente, además de la eficacia de un producto, es necesario considerar la sostenibilidad de su aplicación y su impacto económico (EPPO, 2001; 2004a; Organisation for Economic Co-operation and Development [OECD], 2001; Pest Management Regulatory Agency [PMRA], 1993).

Eficacia biológica directa

La eficacia directa del bioplaguicida se refiere tanto al efecto de este sobre la plaga objetivo (insecto o fitopatógeno) como a sus posibles efectos negativos sobre el cultivo o sobre el producto mismo durante el almacenamiento. Los datos obtenidos deben llevar a determinar la duración, coherencia del control o efecto deseado, rendimiento y calidad del producto. También a partir de los datos debe ser posible establecer las condiciones de uso, tales como la dosis mínima efectiva, los umbrales de plagas (si están disponibles), la frecuencia y el método de aplicación. Otra información importante que se debe discriminar dentro de la eficacia tiene que ver con la tolerancia del cultivo al bioplaguicida, la cual incluye la fitotoxicidad que el producto pueda causar, la posible reducción del rendimiento, los efectos sobre la calidad del producto (incluidos los procesos de transformación) y cualquier posible efecto sobre plantas o partes de estas utilizadas para la propagación.

Sostenibilidad agronómica

La evaluación de la sostenibilidad agronómica del bioplaguicida es un criterio fundamental. De acuerdo con esta, el bioplaguicida no debe afectar la sostenibilidad del sistema de producción ni de ningún otro sistema de producción sucesivo o adyacente. Dentro de los efectos indeseables en los cultivos, se encuentra el desarrollo de la resistencia al producto (fenómeno poco frecuente en el caso de bioplaguicidas). Sin embargo, varias especies han llegado a desarrollar resistencia en campo cuando se aplican formulaciones a base de *B. thuringiensis* contra insectos lepidópteros como *Plutella xylostella* (Tabashnik, 1994), *Trichoplusia ni* (Janmaat & Myers, 2003) y *Plodia interpunctella* (McGaughey, 1985). También se ha registrado resistencia en el caso de *Bacillus sphaericus* usado para el control de dípteros (Charles et al., 1996) y de baculovirus aplicados contra lepidópteros tales como *Anticarsia gemmatalis* (Abot et al., 1996), *Phthorimaea operculella* (PhopGV) (Briese, 1986), *Spodoptera frugiperda*, (Reichelderfer & Benton, 1974) y *Cydia pomonella* (Sauphanor et al., 2006; Schmitt et al., 2013). Otras situaciones que se presentan son los efectos sobre cultivos sucesivos o sustitutivos, sobre cultivos adyacentes, sobre organismos no objetivo (impacto sobre polinizadores o sobre el proceso de polinización, por ejemplo) y efectos sobre enemigos naturales de las plagas objetivo o de plagas secundarias. Además de los efectos negativos, también deben observarse los efectos positivos del bioplaguicida sobre plagas diferentes al objeto de evaluación.

Es necesario, igualmente, determinar si el bioplaguicida es compatible con las prácticas de producción comúnmente usadas por los agricultores o con los programas existentes de manejo integrado de plagas (MIP) o de manejo integrado del cultivo (MIC).

Beneficios económicos

El uso de un bioplaguicida debe representar un beneficio económico positivo para el productor, es decir, los rendimientos o ingresos de los agricultores deben superar los costos tanto directos como indirectos derivados del uso del producto. Puede hacerse una comparación entre el uso del bioplaguicida y el testigo absoluto. Sin embargo, cuando ya se hayan utilizado productos fitosanitarios para el manejo de la plaga en cuestión, es más adecuado comparar el bioplaguicida con los productos fitosanitarios registrados. También debe evaluarse el uso de bioplaguicidas en comparación con enfoques alternativos como medidas culturales o agronómicas, cultivos resistentes o tolerantes a las plagas o a malezas, y con otros componentes del programa MIP.

Principios generales para el diseño de ensayos de eficacia

Los ensayos de eficacia son el paso más importante para determinar el efecto de nuevos agentes biocontroladores o bioplaguicidas, pues permiten validar todos los supuestos hechos en las etapas anteriores. Estos incluyen diferentes etapas que se amplían a continuación.

Dosis mínima efectiva

Uno de los objetivos fundamentales de las pruebas de eficacia es determinar la dosis mínima efectiva (EPPO, 2004b; PMRA, 2003), la cual debe recomendarse en la etiqueta del producto. Para establecerla es necesario demostrar que proporciona uno o varios efectos en comparación con una dosis más baja, por ejemplo, un mayor nivel de efectividad, una mayor persistencia o un rendimiento más consistente en condiciones variables, entre otros.

Ubicación de los ensayos

Los ensayos deben llevarse a cabo en lugares representativos tanto del sistema de producción como de las plagas objeto de control. Si existe la posibilidad de que los tipos de suelos puedan afectar a la eficacia del bioplaguicida, los diferentes sitios de ensayo deben elegirse de manera que sean representativos de los tipos de suelos en los que se desarrolle el cultivo. Dentro de cada sitio de ensayo, las condiciones ambientales y agronómicas deben ser lo más uniformes posibles.

Número de ensayos

Para demostrar la eficacia de un bioplaguicida, es necesario llevar a cabo una serie de ensayos en diferentes regiones, con condiciones ambientales distintas y, de ser posible, en diferentes épocas y estados fenológicos de las plantas. Esto se conoce como "serie de ensayos", "ensayos en múltiples sitios" o "ensayos en varios años". El número de ensayos que se requiere en una serie no es fijo, pues depende de factores tales como la importancia general del cultivo o de la plaga, la gravedad de los daños, los diferentes cultivares, el impacto del suelo y el clima. El número de ensayos ideal es de diez, desarrollados en dos años, aunque se pueden desarrollar menos ensayos en los casos siguientes: en lugares con poca variación climática, para aquellas plagas que presentan muchos antecedentes de control con el agente de control biológico, cuando se trate de cultivos menores o cuando las plagas tengan ocurrencia esporádica (EPPO, 2004c). Asimismo, cuando se someta a registro un cambio en el proceso de producción o de formulación de un bioplaguicida con el mismo ingrediente activo, es posible limitar considerablemente el número de ensayos de eficacia ("datos de transición").

Tipo de diseño

Los ensayos de eficacia deben diseñarse de manera que se pueda realizar un análisis estadístico apropiado. Los principales diseños utilizados son completamente al azar o bloques al azar: el primero solo puede aplicarse si el entorno del ensayo es completamente homogéneo, mientras que el segundo es, en general, el más apropiado para las pruebas de eficacia. Un bloque es un grupo de parcelas dispuestas en un área dentro de la cual el ambiente es homogéneo. Usualmente, cada tratamiento aparece solo una vez en cada bloque. La disposición de los bloques debe ser tal que la heterogeneidad del entorno o de las condiciones de tratamiento se controlen tanto como sea posible (es decir, que la variabilidad entre las parcelas dentro de los bloques sea menor que entre bloques). En algunos casos, se necesita un diseño multifactorial si se evalúan varias dosis del mismo producto. También se utiliza un diseño de parcela dividida, en el que las parcelas principales se subdividen en subparcelas. Sin embargo, el tamaño de las subparcelas debe ser suficiente para permitir un tratamiento y una evaluación fiables (EPPO, 1999).

Como regla general, un ensayo debe incluir al menos cuatro repeticiones por tratamiento. El número exacto depende de la potencia requerida y de la variabilidad en las poblaciones de los organismos objetivo, entre otros factores. Como se mencionó anteriormente, la elección del diseño experimental también influye en la potencia del ensayo para detectar una diferencia significativa. Generalmente se considera que, para un análisis estadístico útil, el número de grados residuales de libertad en el diseño experimental debe ser de al menos doce (EPPO, 1999; Mead et al., 2002).

Para los ensayos de eficacia, el tamaño de la parcela depende de muchos factores, como la movilidad del organismo objetivo (por lo general se necesitan parcelas mayores para organismos más móviles), la técnica de aplicación (las técnicas de aplicación que depositan el producto de una manera más precisa y localizada requieren parcelas más pequeñas), el tamaño, el tipo del cultivo, el tipo de planta y la técnica de cosecha.

Condiciones para el ensayo

En los ensayos de eficacia siempre deben registrarse las condiciones meteorológicas: la temperatura ambiente,

la humedad relativa, la precipitación, la velocidad y la dirección del viento. También deben conocerse las condiciones básicas del suelo: el pH, el contenido de materia orgánica, la humedad y el tipo de suelo.

Evaluación de la eficacia biológica

Las variables que deben evaluarse para determinar la eficacia del bioplaguicida dependerán en gran medida del cultivo y de la plaga objeto de estudio. Dentro de estas están la densidad o incidencia de la plaga, los niveles de infestación, el porcentaje de mortalidad o control, la severidad de los síntomas o de daño al cultivo, el rendimiento y la calidad del producto. Parámetros como la reducción de la población (expresada como porcentaje de mortalidad) deben ser corregidos para tener en cuenta la mortalidad en las parcelas del testigo no tratado.

Durante el ensayo de eficacia, deben hacerse otras observaciones para determinar la tolerancia de los cultivos al producto aplicado. Se debe analizar la fitotoxicidad, los efectos adversos sobre el rendimiento y la calidad de los cultivos, cualquier efecto sobre las plantas o las partes de las plantas utilizadas para la propagación, los efectos sobre cultivos sucesivos y los efectos secundarios sobre organismos benéficos. Del mismo modo, se recomienda analizar si el tratamiento con el bioplaguicida produce efectos negativos sobre el color, olor o sabor del producto cosechado o sobre su procesamiento.

En Colombia, el ICA es la entidad encargada de regular y garantizar la calidad de los insumos agrícolas y las semillas que se usan en el país. Esta entidad, mediante la Resolución 000698 del 4 de febrero de 2011, estableció los requisitos para las pruebas de eficacia de bioplaguicidas, las cuales deben llevarse a cabo por parte los departamentos técnicos registrados ante esta entidad. En dicha resolución están definidos los requisitos para registrarse como departamento técnico y para desarrollar dichas pruebas. El artículo 8 especifica el trámite para realizar los ensayos de eficacia agronómica con miras a la obtención del registro de un bioplaguicida (Resolución 000698, 2011):

> El interesado en registrar un producto debe presentar ante el ICA, con mínimo treinta (30) días calendario a la fecha de iniciación de los ensayos de eficacia, el protocolo con fines de registro o ampliación de uso de bioinsumos para su aprobación, por cultivo y blanco biológico, basado en el método científico, el cual debe contener la siguiente información: Nombre del ensayo, Introducción, Reseña del problema, Revisión de la literatura, Justificación, Objetivos específicos, Información general del producto, Materiales y métodos, Diseño experimental, Número de tratamientos, Número de replicaciones, Análisis estadístico, Desarrollo, Área de parcela o unidad experimental, Área de cosecha o área útil, Escalas de evaluación a utilizar, Épocas de aplicación según fenología del cultivo, Épocas y métodos de evaluación, Datos a tomar, Número de plantas por parcela, Rendimiento en kg/parcela y kg/ha cuando proceda, Medidas de las evaluaciones, Definir otros componentes de rendimiento o eficacia que procedan, Nombre del profesional responsable de la ejecución del ensayo, Recibo de pago de la tarifa establecida por el ICA.
>
> Al protocolo se debe anexar la siguiente información: Domicilio del Departamento Técnico. Composición garantizada del producto, incluyendo ingredientes activos y aditivos si los requiere, Condiciones de almacenamiento y mantenimiento del producto, Indicar las condiciones previas a la aplicación del producto según la actividad biológica a evaluar.
>
> El ICA, mediante oficio, dentro de los quince (15) días hábiles siguientes a la radicación del protocolo lo aprobará o rechazará. Si es del caso, solicitará la adición o modificación de la información presentada, para lo cual se otorgará un término máximo de treinta (30) días calendario. Vencido este término si el interesado no ha aclarado la información o enviado los documentos requeridos se considerará que desiste de la solicitud procediendo mediante oficio a la devolución del mismo dentro de los quince (15) días hábiles siguientes con sus anexos, sin perjuicio de que pueda presentarla de nuevo con el cumplimiento de los requisitos establecidos en este artículo.
>
> Una vez aprobado, el protocolo tendrá una vigencia de tres (3) años, término durante el cual debe realizar la prueba de ensayo de eficacia en dos (2) zonas agroecológicas diferentes.

El ICA emitirá concepto de eficacia agronómica aprobado o rechazado según corresponda y se dejará una copia al interesado. Cuando el concepto sea aprobado, el interesado debe registrar el producto dentro del año siguiente al desarrollo del ensayo de eficacia. Vencido este término si no registra el producto o cuando el concepto sea rechazado debe realizar nuevamente el ensayo de eficacia.

Modelo de negocios

Un modelo de negocios es "una herramienta conceptual que, mediante un conjunto de elementos y sus relaciones, permite expresar la lógica mediante la cual una compañía intenta ganar dinero generando y ofreciendo valor a uno o varios segmentos de clientes, la arquitectura de la firma, su red de aliados para crear, mercadear y entregar este valor, y el capital relacional para generar fuentes de ingresos rentables y sostenibles" (Osterwalder, 2004). Existen diferentes tipos de modelo de negocios, pero uno de los más recientemente empleados es el modelo de negocio diseñado por Alexander Osterwalder. Este modelo incluye nueve módulos que cubren las cuatro áreas principales de un negocio: clientes, oferta, infraestructura y viabilidad económica (figura 12.3) (Osterwalder & Pigneur, 2010).

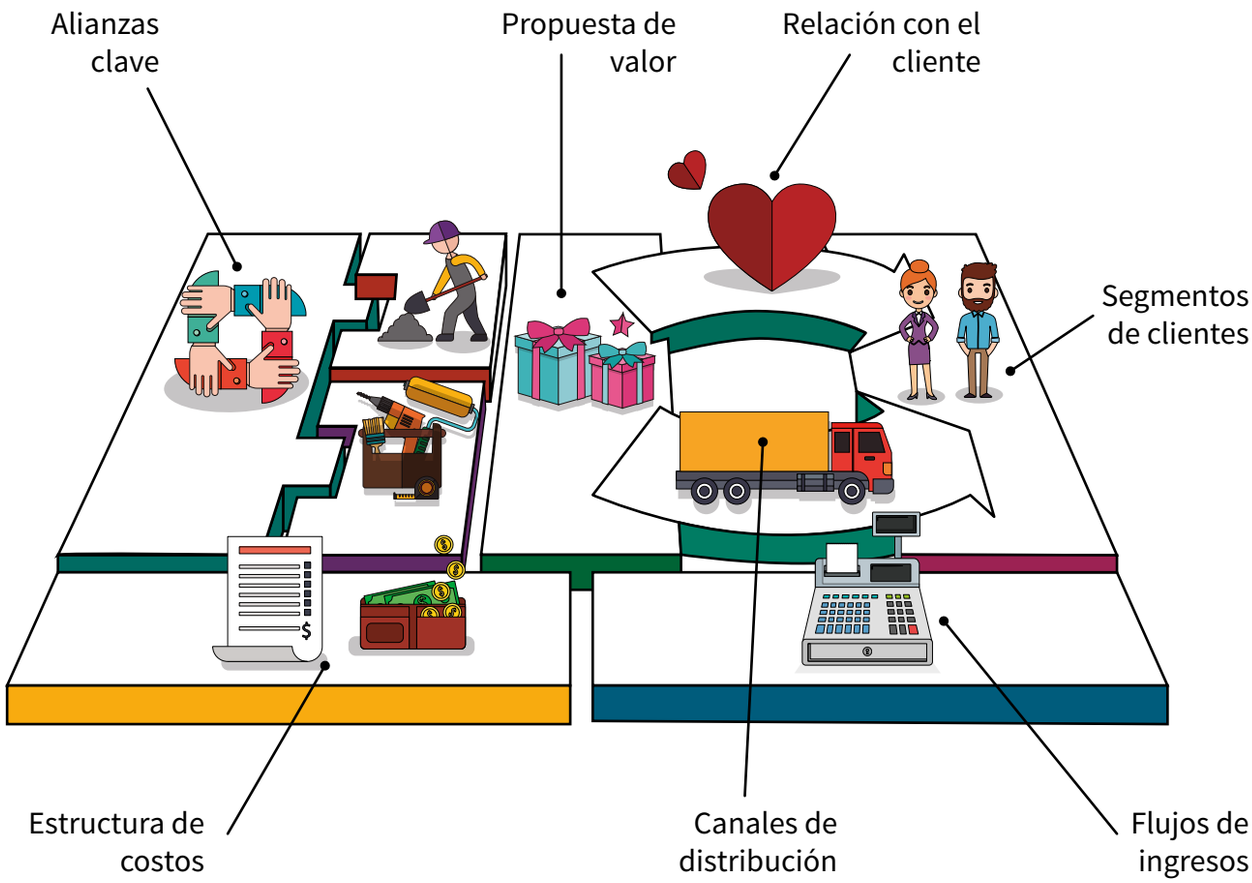


Figura 12.3. Modelo de negocio Canvas.

Fuente: Adaptado de Osterwalder y Pigneur (2010)

En el módulo de *segmentos de clientes* se listan los diferentes tipos de consumidores del producto a quienes se quiere llegar (grandes y pequeños productores, agremiaciones, etc.), con base en las necesidades particulares de estos, la forma de acceder a ellos, el tipo de relación y la rentabilidad, entre otros. Después, se procede a describir en mayor detalle a cada uno de ellos, según variables demográficas, geográficas y psicográficas (regiones de producción, formación académica, género, edad del productor, etc.), entre otras.

El segundo módulo es la *propuesta de valor* de la oferta, en la cual se evidencia lo que atrae a los clientes, es decir, aquello por lo que están dispuestos a pagar: eficacia, mayor producción por hectárea, mejor calidad de la cosecha, reducción de costos de manejo, etc. Puede haber una oferta única o varias ofertas y estas pueden dirigirse a un segmento en particular o a varios de ellos (Márquez, 2010).

El tercer módulo son los *canales de distribución y comunicación*. En este módulo se identifican los medios a través de los cuales se accede a los clientes para comunicarse con ellos y para ofrecer la propuesta de valor (fuerza de ventas, puntos de venta, afiliaciones, publicidad, reuniones, sitios web, etc.) (Márquez, 2010).

El cuarto módulo es *tipo de relaciones con los clientes*, en el cual se establece la clase de contactos que se van a mantener con los segmentos atendidos: presenciales, portales web o de voz, entre otros (Márquez, 2010).

El módulo de *fuentes de ingresos* se refiere a los medios por los cuales se captan ingresos por la propuesta de valor que se ofrece, por ejemplo, ventas, servicios y licenciamientos , entre otros (Márquez, 2010).

En el módulo de *recursos clave* se tiene en cuenta el capital que la compañía debe invertir para hacer que el negocio funcione: recursos físicos, intelectuales (transferencia de *know how*), humanos y financieros. Estos recursos pueden ser propios, arrendados o adquiridos de sus aliados más importantes.

El séptimo módulo, *actividades clave*, se refiere a todo lo que se debe hacer para producir la oferta de valor y gestionar las relaciones con clientes y aliados. La *red de aliados*, por su parte, el octavo módulo, tiene que ver con proveedores o socios que deben encontrarse para establecer relaciones. Para lograr ciclos de innovación más rápidos y exitosos, cada vez es más importante apalancarse en recursos y actividades con terceros, con los que se puede construir o complementar la oferta de valor u optimizar costos (Márquez, 2010).

El último módulo, la *estructura de costos*, se refiere al listado de los rubros más significativos del modelo de negocio (Márquez, 2010). Es importante conocer la estructura de costos e ingresos, ya que, con la evaluación financiera del modelo, es posible tomar decisiones estratégicas y comercialmente apropiadas. Es por eso que hoy por hoy existen diferentes modelos de funcionamiento, ya sea mediante la tercerización de una parte o de todo el proceso de producción, distribución, licenciamiento de tecnologías, creación de nuevas líneas de categorías de productos o compra de empresas.

Para el desarrollo de bioproductos, es indispensable identificar cada uno de estos bloques y definir las acciones a tomar. No es suficiente contar con una propuesta de valor diferenciadora y un segmento claramente identificado, sino que todos los demás aspectos deben evaluarse. Es necesario conocer, por ejemplo, si la capacidad instalada permite producir la cantidad de producto requerido para cubrir la demanda y atender el mercado o si es necesario contar con un aliado estratégico para tal fin. Adicionalmente, es fundamental conocer la forma de interactuar con los clientes y la forma de hacer disponibles los productos, de lo contrario, no es posible transferir (vincular) los productos al mercado.

Potencial de mercado

La demanda de un producto es el volumen total que podrá comprar un grupo de clientes en una determinada área geográfica, durante un cierto periodo de tiempo, en un medio comercial definido y según un programa comercial determinado. Así, el potencial de mercado es el límite alcanzado por la demanda al aumentar lo más posible el esfuerzo comercial en un determinado ambiente (Quintana-Navarro, 2010).

Para lograr atender un mercado específico, es necesario segmentar el mercado, es decir, dividir el mercado potencial en un determinado número de subgrupos con

características lo más homogéneas posibles. Segmentar no es únicamente dividir un mercado más amplio en otros más pequeños, sino hacerlo de modo que esta división dé lugar a submercados con un comportamiento comercial diferente (Quintana-Navarro, 2010). Por ejemplo, el mercado de bioplaguicidas se puede segmentar por el tipo de acción (bioinsecticidas, biofungicidas, bionematicidas y bioherbicidas), por área geográfica, por tipo de principio activo, por tipo de cultivo, por tipo de formulación, etc.

Los bioplaguicidas siguen siendo productos de nicho. El tamaño del mercado se determina por la importancia de la plaga, el número de cultivos en los cuales la plaga es un problema serio y la extensión de estos cultivos. Para lograr una estimación acertada del tamaño de mercado objetivo se debe estudiar el tamaño del mercado en hectáreas, el número de temporadas para cultivar, la competencia y los costos de aplicación. Las cifras de daño causado por las plagas no se pueden transferir directamente al posible potencial de mercado. El poco conocimiento sobre las plagas, los clientes, los cultivos, las prácticas de control, los precios, la competencia y los requisitos para promover un nuevo producto pueden conducir a errores y, seguramente, a una lenta penetración en el mercado (Ravensberg, 2011).

Escalamiento piloto de bioplaguicidas

En esta fase se realiza la optimización de medios de cultivo, el escalamiento y la validación a nivel piloto de las operaciones unitarias relacionadas con la producción del bioplaguicida. Estas operaciones incluyen el proceso de fermentación, las operaciones "aguas abajo" (como separación y purificación) y el proceso de formulación. En todo el proceso es crucial determinar cómo las diferentes etapas pueden afectar la actividad biocontroladora del microorganismo y, por supuesto, determinar la eficacia del bioplaguicida escalado. Además, se realiza el primer acercamiento al modelo de negocio, lo que incluye los beneficios estimados, el análisis de mercado (segmentos, competencia y mercado meta) y el listado de actividades y recursos.

Optimización de medios de cultivo

La optimización de medios de cultivo continúa siendo uno de los aspectos más investigados y con mayores desafíos en los procesos de producción de microorganismos o de sus metabolitos a gran escala. Antes de 1970, la optimización de medios de cultivo se llevaba a cabo mediante el uso de métodos clásicos, que eran costosos, demandaban tiempo, implicaban un gran número de experimentos y eran poco eficientes. Sin embargo, con la llegada de técnicas matemáticas y estadísticas modernas, la optimización de los medios de cultivo se ha vuelto más dinámica, eficaz, económica y robusta en sus resultados. Está ampliamente aceptado que, para mejorar un medio de cultivo a partir de un diseño experimental, se requiere la selección idónea de la técnica de optimización (figura 12.4). Como se mencionó previamente, el DOE define las variantes del medio a ser evaluadas, el número de réplicas y el arreglo de evaluaciones. Con base en los resultados experimentales, se escoge la técnica de optimización para generar un modelo matemático que permita hacer ajustes en la composición del medio y aumentar los rendimientos. Entre los diseños de experimentos para la optimización de medios de cultivo más usados se encuentran el central compuesto (CCD, por su sigla en inglés) y el Box-Behnken (Singh, Yadav et al., 2016).

Diseño central compuesto (CCD)

Diseños de selección como el Plackett Burman o el factorial fraccionado no consideran las interacciones de los componentes en el medio de cultivo, de modo que en la fase de optimización se deben utilizar diseños experimentales que identifiquen estos fenómenos y los modelen. Los CCD fueron descritos por Box y Wilson (1951), y fueron muy utilizados con técnicas de superficie de respuesta (RSM, por su sigla en inglés) para identificar combinaciones óptimas en espacios experimentales previamente definidos. Estos diseños contienen en sí un diseño factorial completo o un factorial fraccionado con puntos centrales más puntos estrella, que permiten la estimación de la curvatura. Si

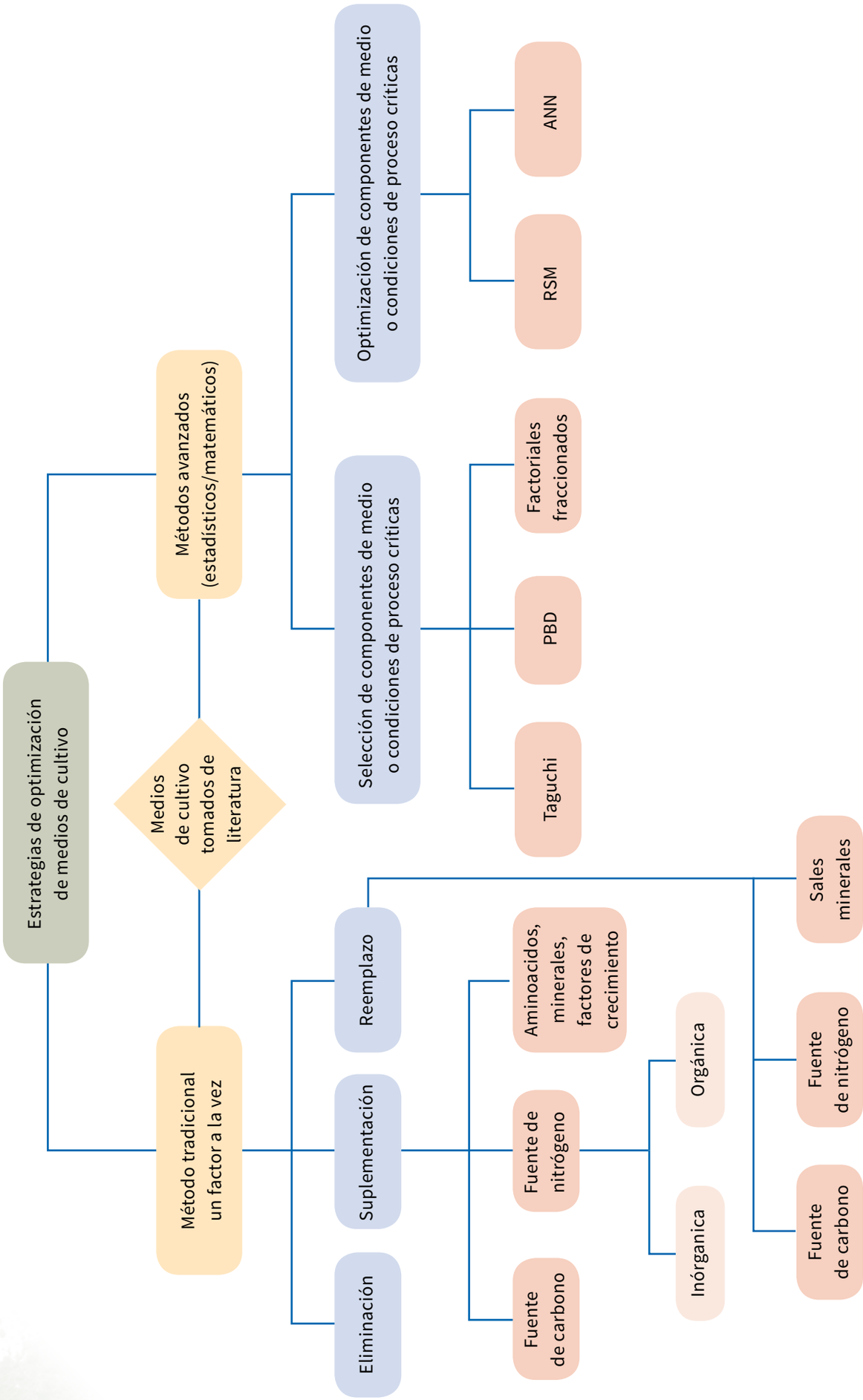


Figura 12.4. Esquema de estrategias usadas en la optimización de medios de cultivo.

Fuente: Adaptada de Singh, Haque et al. (2016)

la distancia del centro del diseño al punto factorial es ± 1 unidades para cada factor, la distancia del centro del diseño hasta el punto estrella es $\pm \alpha$ con $|\alpha| > 1$. El valor preciso de α depende de ciertas propiedades deseadas para el diseño y del número de factores involucrados (Singh, Yadav et al., 2016). El punto central "0" se suele ejecutar en réplicas con el propósito de mejorar la precisión del modelo generado. Además, se estiman eficientemente los términos de primer orden y de segundo orden. De acuerdo con el número de experimentos y los niveles de los factores, los diseños CCD pueden ser de tres tipos: central circunscrito, inscrito y centrado en las caras. Por último, los diseños centrales compuestos pueden ser aplicados en experimentos secuenciales, ya que, una vez se ejecuta un experimento factorial, este se puede ampliar insertando los puntos axiales y centrales faltantes. En la tabla 12.5 se presentan algunos ejemplos de aplicación.

Diseños Box-Behnken

Los diseños Box-Behnken (BBD, por su sigla en inglés) son una alternativa al diseño central compuesto (CDD) y son independientes de un diseño cuadrático: no contienen en sí un diseño factorial o factorial fraccionado, por lo que no son adecuados para experimentos secuenciales (Ferreira et al., 2007). Los diseños de Box-Behnken son más efectivos cuando se tiene más certeza de la zona segura para optimización. Estos diseños no tienen puntos axiales (por lo que se puede estar seguro de que todos los puntos de diseño se encuentran dentro de la zona de optimización), en contraste con los CDD, que suelen tener puntos axiales fuera del "cubo", los cuales podrían no estar en la región de interés o podrían ser imposibles de realizar.

Para un BBD, los puntos de diseño se sitúan en combinaciones de los niveles altos y bajos de los factores, y sus puntos medios se ubican en los bordes del espacio experimental, lo que les confiere la propiedad de rotabilidad, con el requerimiento de al menos tres factores continuos. No obstante, los BBD tienen limitadas capacidades para un bloqueo ortogonal comparados con los CCD; pero, dado que los BBD requieren menos puntos de diseño, su realización puede ser menos costosa que la de los CCD con el mismo número de factores. En la tabla 12.5 se presentan algunos ejemplos de aplicación.

Metodología de superficie de respuesta

La metodología de superficies de respuesta (RSM) es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas robustas, que incluyen diseños de experimentos y análisis de regresiones. Las RSM son útiles para modelar y analizar problemas en los cuales la respuesta buscada es el resultado de la interacción de diversas variables y, además, se busca optimizar dicha respuesta.

La RSM emplea varias fases de optimización (Gupte & Kulkarni, 2003), que son llevadas a cabo en tres pasos básicos: una fase de selección de factores, una de técnica de paso ascendente/descendente (*steepest ascent/descent*) y, finalmente, una de ajuste y optimización mediante regresión cuadrática con análisis de regresiones canónicas. Uno de los principales resultados es la representación en gráfica de superficie de la variable obtenida (Zhang & Gao, 2007). El análisis de RSM ha sido utilizado frecuentemente para la optimización de medios de cultivo en la producción de bioplaguicidas. Díaz et al. (2005), por ejemplo, llevaron a cabo la optimización del medio de cultivo para la producción de biomasa de la levadura *Pichia onychis*, usada para el control de patógenos en poscosecha, mediante la aplicación de una estrategia secuencial que incluyó un diseño factorial fraccionado seguido de un diseño central compuesto rotacional que generó superficies de respuesta. Este análisis permitió mejorar en un 42 % el rendimiento en biomasa de la levadura. En la tabla 12.5 se resumen otras aplicaciones exitosas.

Redes neuronales artificiales

Una red neuronal artificial (ANN, por su sigla en inglés) es un modelo matemático o computacional que está influenciado por los aspectos estructurales o funcionales de las redes neuronales biológicas. Una ANN imita la capacidad de aprendizaje del cerebro (Bhagat, 1990). Consiste en una entrada (como la

sinapsis), que se pondera por pesos (fuerza de las respectivas señales) y luego es calculada por una función matemática que determina la activación de la neurona. Las ANN han sido ampliamente aplicadas con gran éxito para el diseño, modelado, optimización y control de sistemas, principalmente, debido a su capacidad para detectar y filtrar señales de ruido y generalizar información a través de un procedimiento de entrenamiento sistemático (Foster & Katz, 1981). Este análisis ha sido utilizado para la optimización de las condiciones tanto de crecimiento como de producción de enzimas (celulasas y xilanasas) en *Trichoderma reesei* (Singh et al., 2008) y para la producción de componentes antifúngicos por parte de *Bacillus amyloliquefaciens* (Caldeira et al., 2011) (tabla 12.5).

Tabla 12.5. Resumen de diseños de experimentos y técnicas de optimización utilizadas en el desarrollo de medios de cultivo para ingredientes activos de bioplaguicidas

Diseño	Técnica de optimización	Microorganismo	Tipo de fermentación	Referencia
PBD	CCD-RSM	*Coniothyrium minitans*	SmF	Chen et al. (2005)
Taguchi	CCD-RSM	*Beauveria bassiana*	SSF	Petlamul y Prasertsan (2014)
BBD	RSM	*Aschersonia placenta*	SmF	Qiu et al. (2013)
PBD	RSM	*Colletotrichum truncatum*	SSF	Silman et al. (1991)
PBD	PBD	*Colletotrichum coccodes*	SmF	Yu et al. (1997)
PBD	BBD	*Trichoderma harzianum*	SmF	Li et al. (2016)
Taguchi	Orthogonal	*Trichoderma harzianum*	SmF	Zhang y Yang (2015)
PBD	CCD-RSM	*Bacillus subtilis*	SmF	Chen et al. (2010)
Regresión lineal		*Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki	SmF	Ennouri et al. (2013)
PBD	CCD-RSM	*Bacillus subtilis*	SmF	Posada-Uribe et al. (2015)
PBD	CCD-RSM	*Bacillus subtilis*	SmF	Sreekumar y Krishnan (2010)
PBD	CCD-RSM	*Bacillus amyloliquefaciens*	SmF	Trakunjae et al. (2015)
FFD	CCD-RSM	*Verticillium lecanii*	SSF	Shi et al. (2009)
	CCD-RSM	*Metarhizium anisopliae*	SSF	Bhanu Prakash et al. (2008)
PBD	CCD-RSM	*Rhodosporidium paludigenum*	SmF	Wang et al. (2011)
ANN	ANN	*Trichoderma reesei*	SSF	Singh et al. (2008)
ANN	ANN-RSM	*Bacillus amyloliquefaciens*	SmF	Caldeira et al. (2011)

Fuente: Elaboración propia

Escalamiento del proceso de producción masiva de los microorganismos biocontroladores

El éxito en la implementación comercial de un bioplaguicida está dado, en buena medida, por la capacidad técnica y tecnológica de llevar a cabo su producción en una escala viable desde el punto de vista industrial. En general, esta escala es del orden de miles de litros o miles de kilogramos de biomasa del microorganismo, que se constituye como ingrediente activo de un bioproducto comercializado. Sin embargo, para alcanzar estos niveles de producción, el investigador cuenta, en la mayoría de los casos, con una cantidad limitada de información experimental, generada en una escala menor, ya sea a nivel de laboratorio (hasta 10 litros) o a nivel de planta piloto (hasta 100 litros).

El núcleo o corazón de cualquier proceso de producción de un ingrediente activo de un bioplaguicida es el biorreactor (figura 12.5). El biorreactor es un equipo complejo que permite el ajuste de los parámetros operacionales adecuados (temperatura, oxígeno disuelto, agitación y pH, entre otros), para llevar a cabo la fermentación del microorganismo bajo las condiciones establecidas en las etapas previas. Por tanto, el ingeniero de producción debe tener el conocimiento y la capacidad para aplicar una estrategia de escalamiento acorde con las posibilidades logísticas y operativas de los biorreactores disponibles en cada una de las escalas evaluadas. Si el tipo de fermentación es líquida (SmF), el diseño más popular es el biorreactor de tanque agitado (STR, por su sigla en inglés), seguido del biorreactor *airlift*, que usa solamente aire forzado y no tiene agitación mecánica. Si el tipo de fermentación es en estado sólido (SSF), los diseños más usados son los biorreactores de bandejas, las columnas o lechos empacados y, en menor medida, los biorreactores con agitación mecánica, como el biorreactor de paletas y el tambor rotatorio.

Fotos: Grupo de Investigación Planta Piloto de Bioproductos de Corpoica

Figura 12.5. Biorreactores de tanque agitado (STR) usados para la producción de bioplaguicidas. a. Biorreactor escala laboratorio de 10 litros; b. Biorreactor escala piloto de 100 litros.

En concordancia con lo mencionado anteriormente, el propósito del escalamiento o escalado hacia arriba es determinar las variables críticas de un proceso y, en función de estas, seleccionar las condiciones de diseño y de operación para asegurar que el efecto de dichas variables se pueda predecir o modelar. De esta manera, se deberían obtener rendimientos similares independientemente de la escala de producción (Harada et al., 2014). Para alcanzar esta meta, el ingeniero de proceso cuenta no solo con su experiencia, sino también con herramientas y conceptos de física e ingeniería.

Similitud geométrica

La similitud geométrica se refiere a la semejanza que existe entre las magnitudes de las relaciones geométricas de los biorreactores usados a escala de laboratorio y planta piloto (Anaya-Durand & Pedroza-Flores, 2008). Si se supone un sistema modelo (escala laboratorio) con dimensiones x_1, y_1 y z_1 y un sistema prototipo (escala planta piloto) con dimensiones x_2, y_2 y z_2, estos son geométricamente similares si se cumple con que cada par de puntos esté relacionado entre sí por un factor de escala geométrico (de forma que haya correspondencia entre cada punto). Esto quiere decir que se puede aplicar el principio de similitud, representado a continuación:

$$\frac{x_2}{y_2} = \frac{x_1}{y_1} = \lambda_1 \ ,\Lambda, \ \frac{y_2}{z_2} = \frac{y_1}{z_1} = \lambda_2 \ ,\Lambda, \ .....\lambda_n$$

Donde λ1, λ2 y λn son los factores de escala geométricos.

Debido a que el cociente altura/diámetro de un biorreactor es la variable geométrica más importante para el diseño de este tipo de equipos, generalmente dicho cociente es usado como criterio de similitud geométrica principal para realizar el escalado hacia arriba, dado que a partir de este se deriva la mayoría de las relaciones geométricas del equipo.

Criterios de escalamiento convencionales

Para obtener una similitud completa entre dos sistemas de fermentación se deberían cumplir, idealmente, además de la similitud geométrica, las similitudes cinéticas, cinemáticas y bioquímicas. Esto se relaciona con el perfil de velocidades y presiones de los fenómenos de transferencia y con la velocidad de las reacciones bioquímicas del microorganismo involucrado en el bioproceso de fermentación. Sin embargo, satisfacer todas las similitudes es imposible, y dado el grado de complejidad asociado a la determinación de las velocidades de todas las reacciones bioquímicas llevadas a cabo por un microorganismo, la mayoría de los autores se han orientado hacia la aplicación de un segundo criterio de escalamiento de tipo fisicoquímico como el siguiente:

- Consumo de potencia por unidad de volumen (P/V)
- Velocidad de punta del impulsor ($n*D_i$)
- Coeficiente volumétrico de transferencia gas-líquido (k_La)

Un ejemplo clásico es la aplicación exitosa del consumo de potencia constante como parámetro de escalamiento en uno de los procesos de fermentación pionero a nivel industrial para la obtención de penicilina (P/V = 1 hp/galón). Método que también ha sido usado más recientemente para fermentaciones que requieren bajos consumos de potencia. No obstante, su aplicación se ve muy limitada en fermentaciones con altos requerimientos energéticos como los cultivos recombinantes de *Escherichia coli* (Kim, Rao, Youn, & Rhee, 2003).

El escalamiento basado en la velocidad de punta del impulsor puede ser aplicado en casos específicos en los que el microorganismo sea altamente sensible al daño mecánico generado por el impulsor, especialmente, en sistemas en los cuales el medio de cultivo tenga características de viscosidad no newtonianas. El escalamiento basado en el tiempo de mezcla constante no puede ser aplicado en la práctica, debido a la ausencia de una correlación adecuada entre el tiempo

de mezcla y la eficiencia de la aireación. Podría ser más interesante y más útil obtener información del tiempo de mezcla o de la velocidad de punta del impulsor en un sistema no newtoniano viscoso.

El coeficiente volumétrico de transferencia gas-líquido (k_La) es actualmente el criterio de escalamiento físico más usado, ya que intrínsecamente incluye los parámetros más relevantes que afectan el suministro de oxígeno dentro del proceso, tales como la agitación, la aireación y la velocidad superficial del gas:

$$k_La = a'(P/V)^b v_G^{\ c}$$

Donde *P* es la potencia entregada al sistema; *V* es el volumen de reacción; *vG* es la velocidad superficial del gas; *a'*, *b* y *c* son constantes específicas del fluido que deben ser determinadas experimentalmente.

Algunos ejemplos de aplicación exitosa del k_La como criterio de escalamiento incluyen la producción de ácido docosahexaenoico en fermentación *fed-batch* por *Schizochytrium* sp. (Qu et al., 2013), la obtención de polihidroxialcanoato (PHA) en biorreactores de 14 y 120 litros por *Halomonas campisalis* (Kshirsagar et al., 2013) y el escalamiento de Erlenmeyer a biorreactor de la producción de biosurfactante a partir de *Bacillus subtilis* (que aumentó en un 28 % la producción máxima: hasta 2,5 g/l, en 44 horas) (Amani et al., 2010). Por otro lado, el k_La también puede ser usado como componente de números adimensionales para el escalamiento de procesos (Yawalkar et al., 2002).

En lo que se refiere a la producción de agentes de biocontrol fúngicos, Verma, Brar, Tyagi, Surampalli y Valéro (2006) evaluaron varios parámetros de desempeño para la fermentación líquida del hongo biocontrolador *Trichoderma viride* mediante Erlenmeyer y fermentador STR de siete litros. Se demostró que el parámetro crítico del proceso fue el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_La), que se asoció directamente al perfil de oxígeno disuelto (DO) durante la fermentación. Se evidenció que a bajas concentraciones de oxígeno (30 %), se aumentó la concentración de conidios, su entomotoxicidad y el índice de inhibición calculado durante los bioensayos de control de calidad del ingrediente activo. Adicionalmente, los autores estimaron el consumo de potencia del sistema en términos de la agitación y la aireación a través del tiempo, y plantearon una estrategia de operación novedosa que podría ser aplicada con otros hongos biocontroladores.

Uso de los números adimensionales como criterio de escalamiento

Una aproximación matemática para generar estrategias de escalamiento es la aplicación de coeficientes o números adimensionales que pueden ser construidos por el método pi de Buckingham (Hubbard, 1987). Se debe tener en cuenta siempre la selección y ajuste apropiado de las variables de proceso que más afectan la producción del ingrediente activo durante la fermentación. Ejemplos bien establecidos y que han demostrado su aplicabilidad en procesos de escalamiento son los siguientes:

- Número de potencia adimensional:

  $$NPo = [P/\rho n^3 d_i^{\ 5}]$$

  Donde *P* es la potencia, ρ es la densidad del caldo de fermentación, *n* es la velocidad de agitación y d_i es el diámetro del impulsor. Esta ecuación tiene aplicaciones y limitaciones similares a las mencionadas con el consumo de potencia, pero como no incluye el volumen del reactor, permite trabajar con escalas más amplias, sin aumentos tan significativos en la potencia de entrada requerida por el proceso.

- Número de Reynolds:

  $$Re = [nd_i^{\ 2}\rho/\eta]$$

  Donde η es la viscosidad cinemática del caldo de fermentación. Se recomienda su aplicación en fermentaciones con alta viscosidad o en caldos no newtonianos, como los generados por algunos hongos filamentosos.

- Número de gaseo

  $N_{Qg} = [q_g/nd_i]$

  Donde q_g es el caudal de gas suministrado al proceso de fermentación. Es un criterio muy útil para fermentaciones aerobias, se puede correlacionar con el nivel de oxígeno disuelto crítico del proceso y permite la integración directa con los sistemas de control tipo cascada de los biorreactores, especialmente, a escala de laboratorio.

- Tiempo de mezcla adimensional

  $T_m'n = [T_m\eta/d_F^2\rho]$

  Donde T_m es el tiempo de mezcla ($T_m = [V/N_n nd_i^3]$)

  Nn es el número de bombeo, dF es el diámetro interno del biorreactor. Es un criterio útil cuando la homogeneidad del sistema es un factor crítico, como en las fermentaciones que requieren de control continuo del pH, de adición de sustrato en sistemas tipo *fed batch* o continuo y de adición de antiespumante, entre otros. Su uso se hace más relevante cuando el cambio de escala se aplica a biorreactores piloto o industriales en los que los tiempos de mezcla intrínsecamente aumentan.

Cualquiera de estos parámetros y coeficientes pueden ser combinados con otras variables para fijar y crear nuevas correlaciones, coeficientes, términos, grupos o curvas características para un proceso de fermentación específico (Wang et al., 1997).

Escalamiento de fermentaciones sólidas

Como se mencionó antes, la fermentación sólida es uno de los sistemas de producción más común para la obtención de microorganismos biocontroladores, especialmente, de hongos filamentosos; sin embargo, su monitoreo, modelamiento y escalamiento continúa siendo hoy en día uno de los mayores retos de la ingeniería bioquímica debido a limitantes técnicas como las siguientes:

- Elevada heterogeneidad del sistema, a causa de la dificultad para obtener un perfil homogéneo y definido de presiones, temperaturas, oxígeno disuelto y nutrientes dentro de las matrices sólidas.
- Elevados volúmenes de inóculos requeridos para obtener un sistema inicial homogéneo, lo que implica tener un sistema de producción de inóculos líquidos (fermentador semilla) de un volumen acorde con la capacidad del fermentador sólido.
- Los tiempos de esterilización de las matrices sólidas son considerablemente más largos que los requeridos para medios líquidos.
- La agitación mecánica es difícil de implementar y se deben aplicar velocidades muy bajas para disminuir al mínimo la posibilidad de daños en las estructuras fúngicas.
- Limitado desarrollo tecnológico de sensores o sondas específicas para el monitoreo de parámetros claves de la fermentación sólida.
- La implementación de operaciones unitarias "aguas abajo" (tales como separación, purificación o concentración) es costosa y no siempre es viable debido a la colonización de la matriz sólida por parte del hongo.
- Baja disponibilidad de diseños comerciales a nivel mundial de biorreactores para fermentación sólida y elevado costo de estos.
- Escaso acceso a la información técnica de punta relacionada con geometrías y tipo de biorreactores, componentes internos, sistemas de esterilización y muestreo y demás aspectos técnicos del diseño de biorreactores que están sujetos a patentes y protección industrial.

Por las razones expresadas, el escalamiento de procesos de fermentación sólida presenta dificultades importantes. Para abordar el análisis del escalado de procesos SSF se han planteado estrategias similares a las descritas anteriormente para sistemas SmF: generar inicialmente criterios asociados a la similitud geométrica entre biorreactores de diferentes escalas y luego plantear, analizar y modelizar en función de un segundo criterio de similitud, ya sea cinético, cinemático o bioquímico.

Entre los criterios de escalamiento más usados para SSF se encuentran los siguientes (Lonsane et al., 1992):

- **Aproximación por ensayo y error.** Esta metodología es la más simple. Implica continuos intentos o ensayos, con rectificaciones puntuales o cambios en variables específicas en cada etapa hasta alcanzar el objetivo. La gran desventaja es el consumo en tiempo y recursos para alcanzar el éxito. Esta técnica se usó a principios del siglo XX, pero prácticamente ha sido descartada en la actualidad.
- **Mantenimiento de la similaridad geométrica.** Esta técnica trabaja sobre la base de usar las mismas proporciones geométricas durante el escalado de planta piloto a nivel industrial. El método fue muy usado especialmente para SmF a partir de 1948, pero ha sido desplazado por otros más eficientes, ya que no aseguraba una adecuada reproducibilidad. Actualmente se usa como primer criterio en conjunto con la aplicación de uno o varios criterios de escalamiento adicionales y simultáneos.
- **Mantenimiento de balances de calor e hídricas constantes.** Este método está basado en el uso de aireación forzada por medio de aire previamente humidificado, para controlar el calentamiento por evaporación generado durante el proceso y asegurar una temperatura relativamente homogénea en la matriz sólida. La humidificación del aire y la recirculación de los gases de salida enfriados también aseguran el control simultáneo de la humedad de los sólidos y aseguran que la velocidad de aireación sea la suficiente para satisfacer la demanda de oxígeno por parte del microorganismo. Esta estrategia fue evaluada para la producción de etanol por *Schwanniomyces castellii* en biorreactores tipo columna, mediante el uso de bagazo de caña como sustrato inerte para absorber los nutrientes en medio líquido. Los tamaños de los fermentadores empleados involucraron un factor de escala gravimétrico de 6-410 a partir de 10 g de sustrato húmedo. Los resultados obtenidos demostraron la aplicabilidad y simplicidad de la técnica propuesta (Saucedo-Castaneda et al., 1992).
- **Modelamiento del crecimiento basado en fenómenos intraparticulares.** Estos modelos hacen uso de ecuaciones mecanicistas y se enfocan en la interacción entre el crecimiento microbiano y la difusión intraparticular de enzimas, productos de la hidrólisis y el oxígeno dentro de las partículas que forman la matriz sólida. Estos modelos dan una visión de cómo estos procesos a microescala pueden potencialmente limitar el desempeño global de un biorreactor SSF. Por ejemplo, el modelo de Rottenbacher, Schossler y Bauer (1987) describe un sistema SSF poco convencional, que incluye *pellets* prensados de *Saccharomyces cerevisiae* dentro de un biorreactor de lecho fluidizado en el que se nebuliza glucosa a presión para la obtención de etanol. El modelo se enfoca en la difusión intraparticular y la reacción de la glucosa con el resultante crecimiento y producción de etanol.

  Un modelo para hongos filamentosos que fue desarrollado por Nopharatana, Howes, y Mitchell (1998) describe el crecimiento de las hifas fúngicas por encima de la superficie de la partícula sólida. El modelo predice cómo cambia con el tiempo la distribución de la biomasa hifal con respecto a la altura por encima de la superficie, y cómo esta depende, a su vez, de la difusión de glucosa desde la superficie del sustrato hacia los extremos hifales que se extienden en el espacio libre rico en oxígeno.

Otros criterios de escalamiento

Según el tipo de fermentación, el microorganismo empleado, los requerimientos de este para el crecimiento, los fenómenos limitantes del bioproceso y otros numerosos factores, es posible diseñar una estrategia de escalamiento específica o "personalizada" que tenga aplicabilidad práctica. Por ejemplo, uno de los limitantes menos analizados en el escalado hacia arriba es la "capacidad de control" de los biorreactores usados en las diferentes escalas de investigación. En general, los biorreactores de laboratorio poseen numerosos lazos de control que permiten tanto el monitoreo como el ajuste minucioso, preciso y automático de todas las principales variables involucradas: temperatura, agitación, aireación, nivel de oxígeno disuelto, presión, control de espuma y pH, entre otros. A medida que se aumenta la escala

(laboratorio ==> piloto ==> industrial), el número de lazos de control disminuye considerablemente, incluso, algunas variables deben ser controladas de forma manual. Esta situación es crítica también cuando se va a transferir un *know-how* a un potencial cliente industrial que no cuente con equipos de fermentación con alto nivel de automatización y control. En estos casos, se puede generar una estrategia de escalamiento robusta que debe ser "simplificada" para que pueda tener aplicación en la escala más alta.

Díaz, García y Mejía (2015), por ejemplo, desarrollaron una estrategia de escalamiento para la rizobacteria *B. amyloliquefaciens*, que se basó en los criterios convencionales de similitud geométrica y velocidad de punta del impulsor asociado a la identificación de un factor crítico sobre el crecimiento microbial, en este caso, la concentración mínima de oxígeno disuelto. Con esto, se generaron todas las cinéticas asociadas al microorganismo (crecimiento, consumo de sustrato, oxígeno disuelto y pH) y los perfiles asociados al control tipo cascada del proceso a escala de laboratorio, con el fin de satisfacer la concentración mínima de oxígeno disuelto. Los datos cinéticos de las variables operacionales de agitación y caudal de aire se transformaron mediante la aplicación de un análisis del tipo de área bajo la curva. Lo anterior permitió obtener una estrategia tipo delta o escalón (figura 12.6), que se pudo implementar en un biorreactor a nivel piloto y que es posible implementar a nivel industrial, aun si se cuenta solamente con un control manual del bioproceso.

Cuando esta estrategia de escalamiento se aplicó para la producción de biomasa de la rizobacteria *B. amyloliquefaciens* Bs006 a nivel piloto (100 L), se obtuvo una biomasa seca de 1,95 g/l, una productividad de 0,08 g/L•h, un rendimiento de 4,94 g/g y un porcentaje de esporulación mayor al 97 %. Estos valores estuvieron en un rango inferior a un cv del 10 % con respecto a los obtenidos a nivel de laboratorio (10 L), lo que demostró la factibilidad y aplicabilidad de dicha estrategia.

Cambio de escala de operaciones unitarias "aguas abajo"

Las operaciones unitarias "aguas abajo" se refieren a todas las operaciones o procesos que se realizan después del proceso de fermentación. Por lo general, incluyen las operaciones de concentración, separación, y purificación del ingrediente activo, mezcla, secado y empaque del bioproducto formulado (figura 12.7).

La estandarización de estas operaciones unitarias es clave para la obtención de un ingrediente activo (biomasa húmeda y caldo de fermentación) con las características (humedad, concentración, pureza química, pH, etc.) que se requieren para operaciones unitarias de formu-lación como la mezcla y la granulación. Sin embargo, la documentación sobre la estandarización de estas operaciones es muy escasa en la literatura científica, debido a los requisitos de equipos necesarios a escala piloto y a la reserva propia de la información generada a escala industrial. Por ejemplo, para la obtención de un bioproducto para el control de fitopatógenos en hortalizas a base del hongo *Trichoderma koningiopsis*, en Corpoica se llevó a cabo el escalamiento de las operaciones unitarias de lavado y separación de la biomasa obtenida mediante un proceso de fermentación sólida sobre un sustrato natural. Inicialmente, se estandarizaron las dos operaciones a escala de laboratorio con el fin de identificar parámetros claves de cada proceso (volúmenes, tiempos, velocidades y esfuerzos cortantes) y así generar límites de aceptación asociados a la calidad del ingrediente activo (concentración, viabilidad y humedad, entre otros). La validez de esta información experimental se comprobó usando equipamiento a escala piloto y demostrando la reproducibilidad de los resultados con la aplicación en varios lotes de producción en tiempos distintos. En los casos requeridos, fue necesario llevar a cabo ajustes secuenciales para satisfacer los límites de aceptación determinados previamente (Gómez, Díaz, & Cruz, 2011).

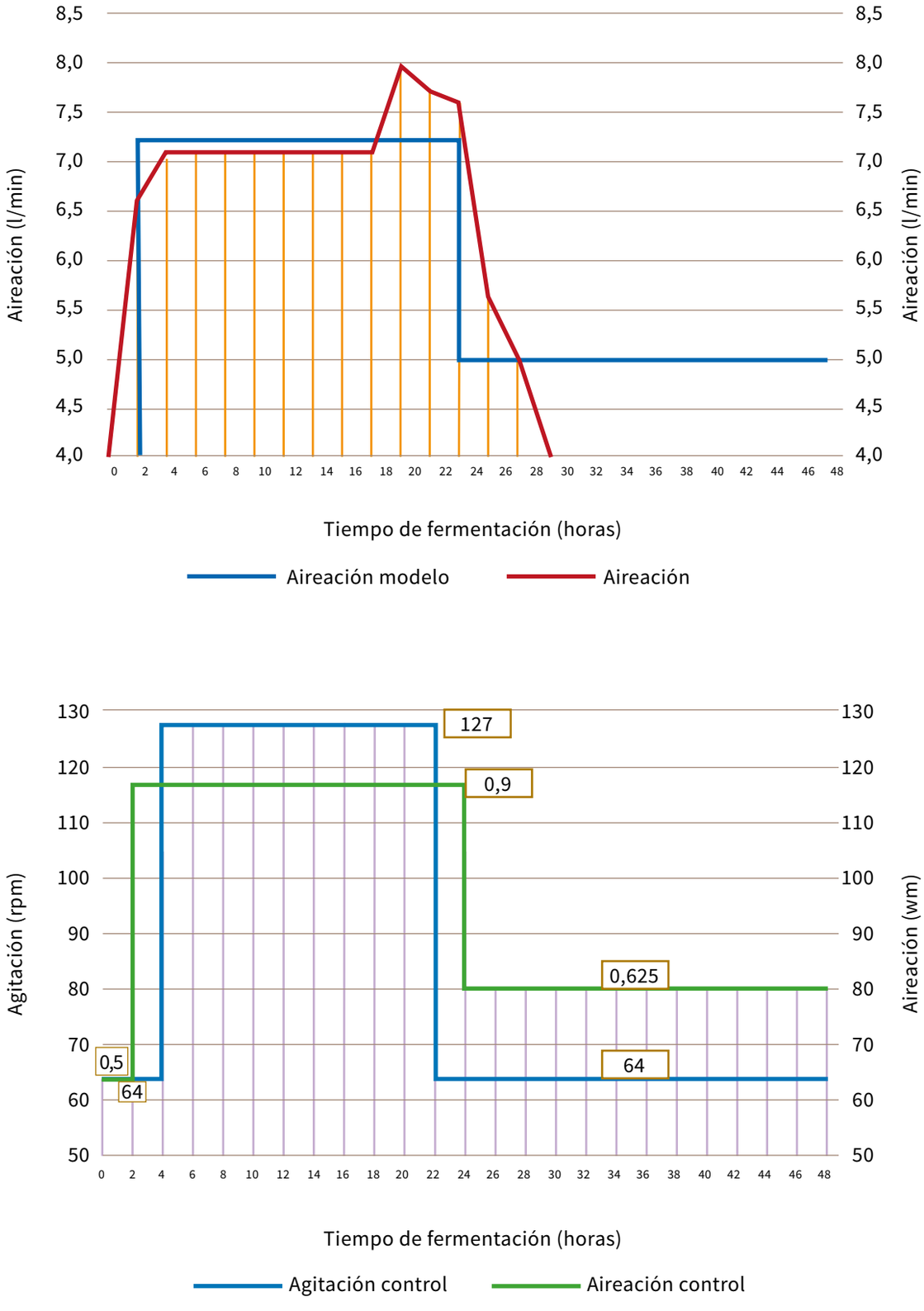


Figura 12.6. Estrategia de escalamiento basada en la capacidad de control del sistema. a. Cinética de control del caudal de aire para *B. amyloliquefaciens* Bs006 en un biorreactor STR a nivel de laboratorio (10 litros) y correspondencia de ajuste a un modelo tipo delta; b. Estrategia de control manual tipo delta para los parámetros operacionales de agitación y aireación para *B. amyloliquefaciens* Bs006 a nivel piloto (100 litros).

Fuente: Díaz, García y Mejía (2015)

Fotos: Grupo de Investigación Planta Piloto de Bioproductos de Corpoica

Figura 12.7. Etapas típicas para la obtención de un bioplaguicida granulado en piloto. a. Mezcla del ingrediente activo con excipientes; b. Granulación en granulador oscilante; c. Secado por fluidización; d. Aspecto de un granulado.

Ajuste y cambio de escala de las formulaciones

En esta etapa se realiza la optimización del prototipo, se determina su actividad en pruebas controladas o de campo y se lleva a cabo el escalamiento de laboratorio a nivel de planta piloto. También en esta etapa se desarrolla el perfeccionamiento del modelo de negocio y se evalúan las ecuaciones de valor para validar los beneficios del bioproducto. Se realiza, además, un acercamiento más detallado al mercado (segmentos objetivo, evaluación de costos y precio, canales y relación con el cliente), la planificación de recursos y actividades, la selección de aliados y el flujo de ingresos y costos.

Para ilustrar lo mencionado, se refiere la experiencia llevada a cabo en Corpoica con el escalamiento de dos formulaciones a base del hongo *Trichoderma koningiopsis*: un granulado dispersable (WG) y un polvo mojable (WP). Se analizaron las operaciones unitarias con cuatro lotes de producción piloto. Para el granulado dispersable se identificaron tres puntos críticos: humedad de la mezcla, pérdidas totales y el rendimiento de lotes de producción. Para el polvo mojable se identificaron cuatro puntos críticos: rendimiento en la separación, concentración de la mezcla, pérdidas totales y el rendimiento de lotes de producción. Con esta información se procedió a generar la fórmula maestra de producción de los dos productos, la cual contiene todos los protocolos operativos estándar de las diferentes operaciones involucradas en el proceso de manufactura (incluyendo el proceso de fermentación) y tiene por objeto definir las especificaciones de todos los materiales y métodos de fabricación e inspección. También sirve como guía para el personal relacionado con el proceso general de manufactura del bioproducto (Gómez et al., 2010).

Costos de producción

La determinación de los costos de producción permite definir el precio de venta del producto en el mercado. El precio se puede establecer de dos maneras: la primera es a partir del margen que se requiere para obtener un beneficio sobre el producto y la segunda es ver cuál es el valor en el mercado y a qué precio será aceptado (Ravensberg, 2011).

El precio de venta depende de la demanda del producto en el mercado y del precio de otras medidas de control de la competencia. El precio del producto es a menudo alto en los primeros años, después de su lanzamiento, con el fin de obtener el retorno de la inversión en un periodo corto.

Lamentablemente, las otras propiedades favorables de los productos de control biológico (seguridad para el ser humano, carencia de residualidad, seguridad con el medio ambiente, etc.) son difíciles de explotar en un precio de venta. La competencia se basa principalmente en factores tradicionales como la eficacia y los costos (Ravensberg, 2011).

Los costos de producción pueden dividirse en costos fijos y variables o en costos directos e indirectos. Los costos fijos suelen ser los gastos de producción: las instalaciones y los equipos de producción. Estos últimos incluyen los biorreactores y los equipos de formulación y envasado. Los costos de instalación y de equipos son calculados normalmente mediante un factor de depreciación. Adicionalmente, los costos de investigación y desarrollo, como se realizan antes de lanzar el producto, son considerados también costos fijos (Ravensberg, 2011).

Cuando una empresa tiene personal permanente en I+D, los costos son vistos como fijos, y parte de ellos puede atribuirse a un determinado producto. Después de la producción comercial de un producto, si la investigación es necesaria para mejorar el producto o su uso, estos costos se considerarán como variables. En el caso de los bioplaguicidas, los costos de registro pueden ser un factor importante y pueden ser contabilizados como costos fijos, ya que se consideran como una inversión y pueden ser calculados con un factor de depreciación (Ravensberg, 2011).

Los costos variables incluyen los costos de las materias primas (medios de producción e ingredientes de formulación): energía, combustible, agua, vapor, costos de materiales de empaque y embalaje y costos laborales de mano de obra. Los costos de control de calidad y eliminación de residuos dependen del nivel de producción (FAO, 1998; Ravensberg, 2011).

Estrategias de mercadeo

Una estrategia de mercadeo es la creación de acciones o tácticas para lograr los objetivos comerciales de la empresa en un mercado específico. El desarrollo de una estrategia de mercadeo suele dividirse en cinco aspectos generales: el análisis del consumidor final, entrega final del producto al consumidor (empaque, dosis, etc.), la definición de precios, la marca, las ventas y la distribución (Union, 2017).

El análisis del consumidor final consiste en descifrar la manera como piensan los clientes y todos los aspectos que podrían influenciar sus decisiones de compra. Los segmentos de clientes en el sector agrícola se pueden clasificar en función de distintos criterios: su tamaño como segmento, el tipo de cultivo que trabajan, la forma en que consultan la información, el modelo preferencial de compra de insumos (ya sea a través de un ejecutivo, un almacén u otro mecanismo) (PMG, 2017).

En el diseño de la estrategia de ventas y distribución, se desarrolla la red de representantes y se gestionan los canales de distribución para tener una participación en el mercado (Union, 2017). Debido a que los bioplaguicidas requieren de un conocimiento previo para su aplicación, es necesario capacitar no solo al usuario final, sino también a los distribuidores seleccionados. La selección de la estrategia de distribución depende del tamaño y la naturaleza del fabricante. Una gran empresa agroquímica, por ejemplo, puede utilizar sus propios puntos de venta para su distribución, mientras que una pequeña puede necesitar otras compañías como sus distribuidores. El uso de grandes empresas agroquímicas como distribuidores no ha dado como resultado ventas exitosas de bioplaguicidas (CPL Business Consultants, 2006), mientras que la alianza con pequeñas empresas ha tenido mayor éxito, aunque con un volumen de ventas menor. Para el productor es de gran importancia tener conciencia sobre el rol de los distribuidores, quienes deben saber sobre el modo de uso del plaguicida y, por lo tanto, ser entrenados periódicamente. Además de esta función, las instalaciones de almacenamiento, el seguimiento de las fechas de caducidad de los productos y el transporte son una tarea relevante para los distribuidores (Ravensberg, 2011).

Fotos: Grupo de Investigación Planta Piloto de Bioproductos de Corpoica

Figura 12.8. Productos bioplaguicidas registrados por AGROSAVIA. a. Tricotec®; b. Baculovirus®; c. Lecabiol®.

Registro y transferencia de la tecnología

En esta etapa se debe cumplir con la reglamentación vigente en el país para el registro de bioproductos y se deben generar e implementar estrategias de vinculación y mercadeo específicas y adecuadas, que conduzcan a que la tecnología desarrollada y escalada en las etapas previas sea efectivamente adoptada por los clientes.

Registro

El tiempo de desarrollo de un producto y el tiempo de registro deben ser estimados de forma tan precisa como sea posible. El primero está en manos del fabricante, al menos en gran medida, razón por la cual se puede hacer una estimación. El segundo depende de las autoridades regulatorias y es, por tanto, difícil de predecir. En Europa, el registro de un bioinsumo puede tardar más de cinco años (Ravensberg, 2011). En Colombia, se estima un tiempo aproximado de dos a tres años, y el trámite de solicitud de registro de venta de bioinsumos se realiza a través del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), específicamente, del Departamento de Inocuidad e Insumos Agrícolas, de acuerdo con el cumplimiento de los requisitos de la Resolución 0698 del 4 de febrero de 2011. En el capítulo 15 se amplía la información sobre los requerimientos para el registro de bioplaguicidas.

Corpoica cuenta con tres bioplaguicidas registrados: Tricotec, Lecabiol y Baculovirus-Corpoica (figura 12.8). Tricotec (a base de *Trichoderma koningiopsis*) para el control de *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* en tomate, de *Sclerotinia minor* y *S. sclerotiorum* en lechuga y de *Rhizoctonia solani* en arroz. Lecabiol (a base de *Lecanicillium lecanii*) para el control de la mosca blanca en algodón. Baculovirus para el control de *Tecia solanivora* y *Phthorimaea operculella* en papa en almacenamiento.

Implementación del modelo de negocio

La implementación del modelo de negocio consiste en llevar el diseño del modelo a la realidad, a través de acciones claras y datos específicos. La implementación debe tener en cuenta los eslabones que conforman la cadena de valor (proveedores, distribuidores, productores, clientes, etc.) y las interacciones entre estos. En Corpoica, el diseño del modelo y su implementación se realizan a la par del desarrollo de cada bioproducto. La propuesta de valor, que inicia como una hipótesis, se va definiendo de manera específica con el desarrollo de pruebas en campo y con el acercamiento que se tiene con el segmento del mercado. También durante el desarrollo de las pruebas se identifican los recursos y actividades requeridas de producción, distribución u otras, y se realiza la búsqueda de aliados, con quienes se formaliza la relación a través de contratos de producción, maquila, transferencia, distribución u otra modalidad que permita definir la relación comercial. La interacción con los clientes normalmente se hará a través de un aliado en distribución, con quien se define la forma de hacer llegar el producto a los clientes y el acercamiento con estos. Por último, la definición de la estructura de costos e ingresos se hace teniendo en cuenta los requerimientos de producción del bioinsumo y las relaciones con los aliados, a partir de lo cual se distribuyen los costos y flujos de acuerdo con los márgenes establecidos para cada eslabón

Conclusiones y perspectivas

La diferencia entre los plaguicidas químicos y los bioplaguicidas microbiales es que estos últimos están constituidos por organismos vivos que tienen la capacidad de proliferar en el campo y que responden al medioambiente de diferentes maneras. Por esta razón, es difícil predecir sus reacciones intrínsecas en la interacción con las plantas objeto de control, las plagas, el microbioma circundante y los demás factores bióticos o abióticos con los que se relacionan.

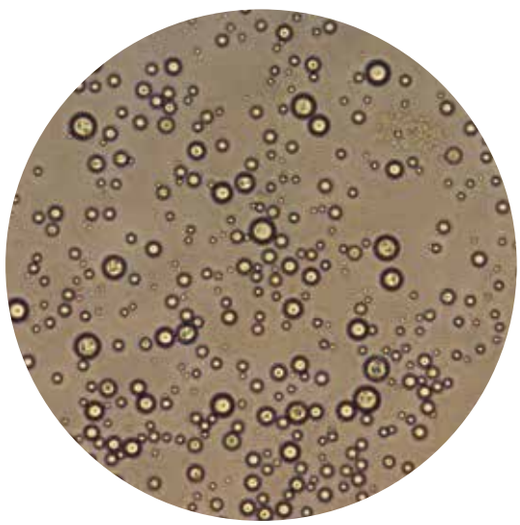
La necesidad de un desarrollo sostenible de la agricultura ha fomentado muchas iniciativas que han estimulado el desarrollo de métodos alternativos que permitan reducir el uso de plaguicidas químicos en el control de plagas. Los bioplaguicidas microbianos representan, por tanto, una de las alternativas más prometedoras y, aunque su comercialización sigue siendo marginal, la demanda está aumentando constantemente en todas partes del mundo. Este significativo aumento coincide con el crecimiento del control biológico de plagas en cultivos de alto valor como hortalizas producidas en invernadero, cultivos frutícolas, viñedos y forestales entre otros. De otra parte, a pesar de que el control biológico ha mostrado un importante desarrollo en agricultura orgánica, el futuro más prometedor de los bioplaguicidas se encuentra en los programas de manejo integrado de plagas (MIP).

A pesar de que hay avances significativos en el conocimiento científico y tecnológico sobre el desarrollo de bioplaguicidas, son pocos los casos en que se han producido formulaciones con una alta y consistente actividad biocontroladora, que además tengan un amplio espectro de uso y respondan a los desafíos económicos. Aunque se han desarrollado muchos bioproductos, varios de ellos han sido retirados del mercado antes de lograr éxito comercial. En los últimos años, ha habido importantes avances en el desarrollo y producción industrial de bioplaguicidas, pero estos aún siguen ocupando un pequeño porcentaje de los productos usados para protección de cultivos. En muchos casos, los centros de investigación o las empresas desarrollan excelentes bioplaguicidas, pero no logran posicionarlos ante los productores. Por esta razón, un producto solo es efectivo si genera impacto en condiciones de campo y si es respaldado por una sólida estrategia de mercado, que garantice la confiabilidad y rentabilidad.

La producción de un bioplaguicida no solo requiere del conocimiento detallado de la microbiología y fisiología del microorganismo biocontrolador, sino del conocimiento de la biología de la plaga, de los aspectos epidemiológicos que definen su efecto nocivo sobre el cultivo, así como de la fisiología de la planta. Además de esto, se debe abordar una serie de desafíos tecnológicos relacionados con el proceso de fermentación, el tipo de formulación, la población de plagas frente a la población microorganismos biocontroladores y los sistemas de aplicación utilizados. Por lo tanto, antes del desarrollo y la aplicación de una formulación, es necesario comprender la ecología de la interacción entre el microorganismo biocontrolador, la planta hospedera y la plaga. Así mismo, en el desarrollo de bioplaguicidas se debe considerar cada paso: la selección del microorganismo, el método de producción, el sistema de entrega, la tecnología de aplicación, los factores que afectan su desarrollo y persistencia en el medio ambiente y, en última instancia, la disponibilidad del producto en el mercado y las diversas acciones de posicionamiento de este para lograr el reconocimiento y aceptación por parte de los agricultores.

Agradecimientos

Los autores agradecen a AGROSAVIA, al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, a Colciencias, a todas las agencias nacionales e internacionales que han financiado las investigaciones desarrolladas en el tema. Asimismo, a sus grupos de trabajo y a sus aliados por haber contribuido significativamente al logro de muchos de los resultados y estrategias de trabajo aquí planteados.



Referencias

Abadias, M., Usall, J., Teixidó, N., & Viñas, I. (2003). Liquid formulation of the postharvest biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 in isotonic solutions. *Phytopathology, 93*(4), 436-442. doi:10.1094/PHYTO.2003.93.4.436.

Abot, A., Moscardi, F., Fuxa, J., Sosa-Gómez, D., & Richter, A. (1996). Development of resistance by *Anticarsia gemmatalis* from Brazil and the United States to a nuclear Polyhedrosis virus under laboratory selection pressure. *Biological Control, 7*(1), 126-130. doi:10.1006/bcon.1996.0075.

Adinarayana, K., & Ellaiah, P. (2002). Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, 5*(3), 272-278.

Aggarwal, A., & Singh, H. (2005). Optimization of machining techniques - A retrospective and literature review. *Sadhana, 30*(6), 699-711.

Aguilera, A. A. (2014). *Vigilancia Tecnológica*. Recuperado de http://huila.gov.co/documentos/V/vigilancia_tecnologica_pioridades.pdf.

Al-Hamdani, A., & Cooke, R. (1987). Effects of water potential on accumulation and exudation of carbohydrates and glycerol during sclerotium formation and myceliogenic germination in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Transactions of the British Mycological Society, 89*(1), 51-60. doi:10.1016/S0007-1536(87)80057-8.

Aldasoro Alustiza, J. C., Cantonnet Jordi, M. L., & Cilleruelo Carrasco, E. (2012). *La vigilancia tecnológica y la inteligencia competitiva en los estándares de gestión de la calidad en I+D+i*. Recuperado de http://adingor.es/congresos/web/uploads/cio/cio2012/SP_04_Gestion_Innovacion_Tecnologica_y_Organizativa/1162-1168.pdf.

Álvarez, F., Castro, M., Príncipe, A., Borioli, G., Fischer, S., Mori, G., & Jofre, E. (2012). The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP218 and ARP23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of *Sclerotinia* stem rot disease. *Journal of Applied Microbiology, 112*(1), 159-174. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05182.x.

Alves, S. B., & Lecuona, R. E. (1998). Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos. En S. B. Alves (Ed.), *Controle microbiano de insetos* (pp. 97-170). Piracicaba, Brasil: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ).

Alves, S. B., Moino, A., & Almeida, J. E. M. (1998). Produtos fitossanitários e entomopatógenos. En S. B. Alves (Ed.), *Controle microbiano de insetos* (pp. 97-170). Piracicaba, Brasil: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ).

Alves, L. F. A, Alves, S. B., Pereira, R. M., & Capalbo, D. M. F. (1997). Production of *Bacillus thuringiensis* Berliner var. *kurstaki* grown in alternative media. *Biocontrol Science and Technology, 7*(3), 377-383. doi:10.1080/09583159730785.

Amani, H., Mehrnia, M. R., Sarrafzadeh, M. H., Haghighi, M., & Soudi, M. R. (2010). Scale up and application of biosurfactant from *Bacillus subtilis* in enhanced oil recovery. *Applied Biochemistry and Biotechnology, 162*(2), 510-523.

Anaya-Durand, A., & Pedroza-Flores, H. (2008). Escalamiento, el arte de la ingeniería química: Plantas piloto, el paso entre el huevo y la gallina. *Tecnología, Ciencia, Educación, 23*(1), 31-39.

Arora, N. K., Mehnaz, S., & Balestrini, R. (Eds.). (2016). *Bioformulations: For sustainable agriculture*. Nueva Delhi, India: Springer.

Aulton, M. E. (2004). *Farmacia: la ciencia del diseño de las formas farmacéuticas*. Madrid, España: Elsevier.

Auria, R., Ortiz, I., Villegas, E., & Revah, S. (1995). Influence of growth and high mould concentration on the pressure drop in solid state fermentations. *Process Biochemistry, 30*(8), 751-756. doi:10.1016/0032-9592(95)00004-6.

Bardin, M., Fargues, J., & Nicot, P. (2008). Compatibility between biopesticides used to control grey mould, powdery mildew and whitefly on tomato. *Biological Control, 46*(3), 476-483. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.05.012.

Barrera, G., Simón, O., Caballero, P., Cuartas, P., Gómez, J., & Villamizar, L. (2012). Caracterización morfológica, genética y biológica de tres aislamientos colombianos de nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda*. En L. Villamizar, J. Guevara, C. Espinel, M. Gómez, J. Gómez, P. Cuartas, … A. M. Cotes, *Desarrollo de un bioplaguicida a base de nucleopoliedrovirus para el control del gusano cogollero del maíz Spodoptera frugiperda* (pp. 21-36). Bogotá, Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica).

Batista Filho, A., Almeida, J. E., & Lamas, C. (2001). Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. *Neotropical Entomology, 30*(3), 437-447. doi:10.1590/S1519-566X2001000300017.

Bagwan, N. B. (2010). Evaluation of *Trichoderma* compatibility with fungicides, pesticides, organic cakes and botanicals for integrated management of soil borne diseases of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *International Journal of Plant Protection, 3*(2), 206-209. Recuperado de http://www.researchjournal.co.in/online/IJPP/IJPP-3-2-2010.htm.

Bhagat, P. (1990). An introduction to neural nets. *Chemical Engineering Progress, 86*(8), 55-60.

Bhanu Prakash, G. V. S., Padmaja, V., & Siva Kiran, R. R. (2008). Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. *Bioresource Technology, 99*(6), 1530-1537. doi:10.1016/j.biortech.2007.04.031.

Box, G. & Wilson, K. (1951). On the experimental attainment of optimum condition. *Journal of the Royal Statistical Society, 13*(1), 270-310.

Boyetchko, S., Rosskopf, E., Caesar, A., & Charudattan, R. (2002). Biological weed control with pathogens: search for candidates to applications. *Applied Mycology and Biotechnology, 2*, 239-274.

Briese, D. T. (1986). Insect resistance to baculoviruses. En E. F. A. Granados (Ed.), *The biology of baculoviruses* (pp. 89-108). Boca Raton, EE. UU.: CRC Press.

Bruck, D. J. (2009). Impact of fungicides on *Metarhizium anisopliae* in the rhizosphere, bulk soil and *in vitro*. *BioControl, 54*(4), 597-606. Recuperado de https://link.springer.com/article/10.1007/s10526-009-9213-1.

Bruckner, S., Albrecht, A., Petersen, B., & Kreyenschmidt, J. (2013). A predictive shelf life model as a tool for the improvement of quality management in pork and poultry chains. *Food Control, 29*(2), 451-460. doi:10.1016/j.foodcont.2012.05.048.

Burges, H. D. (1998). Formulation of mycoinsecticides. En *Formulation of microbial biopesticides* (pp. 131-185). Dordrecht, Holanda: Springer. doi:10.1007/978-94-011-4926-6.

Caldeira, A. T., Arteiro, J. M., Roseiro, J. C., Neves, J., & Vicente, H. (2011). An artificial intelligence approach to *Bacillus amyloliquefaciens* CCMI 1051 cultures: Application to the production of anti-fungal compounds. *Bioresource Technology, 102*(2), 1496-1502. doi:10.1016/j.biortech.2010.07.080.

Chaparro, A., Cardona, C. A., Orrego, C. E., Yépes, F. C., Serna, L., & Ospina, S. A. (2013). *Plan Global de Desarrollo 2010-2012. Prospectiva UN - Agendas de conocimiento. Agenda: Biotecnología*. Recuperado de https://goo.gl/upvqBo.

Charles, J.-F., Nielson-LeRoux, C., & Delecluse, A. (1996). *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. *Annual Review of Entomology, 41*, 451-472. doi:10.1146/annurev.en.41.010196.002315.

Chen, L., Yang, X., Raza, W., Luo, J., Zhang, F., & Shen, Q. (2011). Solid-state fermentation of agro-industrial wastes to produce bioorganic fertilizer for the biocontrol of *Fusarium* wilt of cucumber in continuously cropped soil. *Bioresource Technology, 102*(4), 3900-3910. doi:10.1016/j.biortech.2010.11.126.

Chen, X., Li, Y., Du, G., & Chen, J. (2005). Application of response surface methodology in medium optimization for spore production of *Coniothyrium minitans* in solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 21*(4), 593-599.

Chen, Z.-M., Li, Q., Liu, H.-M., Yu, N., Xie, T.-J., Yang, M.-Y., … Chen, X.-D. (2010). Greater enhancement of *Bacillus subtilis* spore yields in submerged cultures by optimization of medium composition through statistical experimental designs. *Applied Microbiology and Biotechnology, 85*(5), 1353-1360. doi:10.1007/s00253-009-2162-x.

Chong-Rodríguez, M. J., Maldonado-Blanco, M. G., Hernández-Escareño, J. J., Galán-Wong, L. J., & Sandoval-Coronado, C. F. (2011). Study of *Beauveria bassiana* growth, blastospore yield, desiccation-tolerance, viability and toxic activity using different liquid media. *African Journal of Biotechnology, 10*(30), 5736-5742. doi:10.5897/AJB10.2264.

Chung, S., & Kim, S.-D., (2005). Biological control of phytopathogenic fungi by *Bacillus amyloliquefaciens* 7079; suppression rates are better than popular chemical fungicides. *Journal of Microbiology and Biotechnology, 15*(5), 1011-1021.

Coca, P., García, A., Santos, D., & Fernández, A. (2010). *Guía de vigilancia estratégica proyecto Centinela: vigilancia estratégica al alcance de las empresas asturianas*. Recuperado de https://goo.gl/Ms4J1C.

Copping, L. (2009). *The manual of biocontrol agents, the biopesticide manual* (4.ª edición). Hampshire, Reino Unido: The British Crop Protection Council.

Corpoica (2015). *Guía ampliada para la pertinencia del mercado*. Recuperado de http://intranet.corpoica.org.co/

GestionOrganizacional/_layouts/15/OSSSearchResults.aspx?k=guia%20ampliada&cs=Esta%20lista&u=http%3A%2F%2Fintranet.corpoica.org.co%2FGestionOrganizacional%2FDocumentacin.

CPL Business Consultants. (2006). A *how to do it guide to biopesticides with historical examples*. Recuperado de https://goo.gl/wr3gjt.

Crowe, J. H., Crowe, L. M., & Chapman, D. (1984). Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science, 223*(4637), 701-704. doi:10.1126/science.223.4637.701.

Cruz, R. D. (2013, noviembre). *Vigilancia tecnológica e innovación*. Documento presentado en Foro Académico Nacional "La competitividad para enfrentar mercados globales", Medellín, Colombia.

Cuthbertson, A. G., Walters, K. F., & Deppe, C. (2005). Compatibility of the entomopathogenic fungus *Lecanicillium muscarium* and insecticides for eradication of sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. *Mycopathologia, 160*(1), 35-41. doi:10.1007/s11046-005-6835-4.

Desgranges, C., Vergoignan, C., Léréec, A., Riba, G., & Durand, A. (1993). Use of solid state fermentation to produce *Beauveria bassiana* for the biological control of european corn borer. *Biotechnology Advances, 11*(3), 577-587. doi:10.1016/0734-9750(93)90026-J.

Dhanya, M. K., Anjumol, K. B., Murugan, M., & Deepthy, K. B. (2016). Compatibility of *Trichoderma viride* and *Pseudomonas fluorescens* with plant protection chemicals and fertilizers in cardamom. *Journal of Tropical Agriculture, 54*(2), 129-135. Recuperado de http://jtropag.kau.in/index.php/ojs2/article/view/380.

Díaz, A., Flórez, J., & Cotes, A. M. (2005). Optimización de un medio de cultivo para la producción de la levadura *Pichia onychis* (Lv027). *Revista Colombiana de Biotecnología, 7*(1), 51-58.

Díaz, A., García, J., & Mejía, C. (2015). Development and application of a scale up strategy for the production of native strain of *Bacillus amyloliquefaciens*. En A. T. Caldeira, A. Candeias, A. Pereira, & M. Rosario (Eds.), *MicroBiotec 15 Congress of Biotechnology and Microbiology*. Évora, Portugal: Greca.

Díaz, A., García, J., & Zapata-Narváez, J. (2015). Improvement of sporulation conditions of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* in liquid fermentation. *Advances in Bioscience and Biotechnology, 6*(4), 302-310. doi:10.4236/abb.2015.64029.

Doelle, H. W., Mitchell, D. A., & Rolz, C. E. (1992). *Solid substrate cultivation*. Londres, Inglaterra: Springer.

Dutta, P., Battacharyya, P. N., Sarmah, S. R., Madhab, M., Sandilya, S. P., Gogoi, D., … Pathak, S. K. (2016). *In vitro* studies on the compatibility assessment of certain agrochemicals with microbial biopesticides used in tea [*Camelia sinensis* (L.) O. Kuntze] of Assam, Northeast India. *Two and a Bud, 63*(1), 13-16. Recuperado de http://www.worldcat.org/title/two-and-a-bud/oclc/1772745.

Ejiofor, A. O. (1991). Production of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 as bioinsecticide using a mixture of 'spent' brewer's yeast and waste cassava starch as the fermentation medium. *Discovery Innovation, 3*(2), 85-88. Recuperado de https://www.ajol.info/index.php/dai.

Elad, Y. & Stewart, A. (2007). Microbial control of *Botrytis* spp. En Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, & N. Delen (Eds.), *Botrytis: biology, pathology and control* (pp. 223-241). Dordrecht, Holanda: Springer.

Elzein, A., Kroschel, J., & Müller-stöver, D. (2004). Optimization of storage conditions for adequate shelf-life of "pesta" formulation of *Fusarium oxysporum* "foxy 2", a potential mycoherbicide for Striga: Effects of temperature, granule size and water activity. *Biocontrol Science and Technology, 14*(6), 545-559. doi:10.1080/09583150410001682278.

Ennouri, K., Ben Hassen, H., & Zouari, N. (2013). Optimization of bioinsecticides overproduction by *Bacillus thuringiensis* subp. *kurstaki* using linear regression. *Polish Journal of Microbiology, 62*(3), 287-293.

European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). (1999). Design and analysis of efficacy evaluation trials. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 42*(3), 297-317.

European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). (2001). Principles of acceptable efficacy. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 31*(2), 331-336. doi:10.1111/j.1365-2338.2001.tb01003.x

European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). (2004a). Introduction to the efficacy evaluation of plant protection products. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 34*(1), 25-29. doi:10.1111/j.1365-2338.2004.00694.x.

European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). 2004b. Minimum effective dose. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 34*(1), 35-36. doi:10.1111/j.1365-2338.2004.00696.x.

European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). 2004c. Number of efficacy trials. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 34*(1), 37-39.

European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). (2014). Principles of acceptable efficacy. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 44*(3), 274-277. doi:10.1111/epp.12135.

European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). (2017). *Good Experimental Practice* (GEP). Recuperado de https://www.eppo.int/PPPRODUCTS/gep/good_experimental_practice.htm.

Faria, M., Hotchkiss, J. H., Hajek, A. E., & Wraight, S. P. (2010). Debilitation in conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae* and implication with respect to viability determinations and

mycopesticide quality assessments. *Journal of Invertebrate Pathology, 105*(1), 74-83. doi:10.1016/j.jip.2010.05.011.

Feng, K.-C., Liu, B.-L., & Tzeng, Y.-M. (2002). Morphological characterization and germination of aerial and submerged spores of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 18*(3), 217-224.

Feng, K. C., Liu, B. L., & Tzeng, Y. M. (2000). *Verticillium lecanii* spore production in solid-state and liquid-state fermentations. *Bioprocess Engineering, 23*(1), 25-29.

Ferreira, S. C., Bruns, R., Ferreira, H., Matos, G., David, J., Brandao, G., ... Souza, A. (2007). Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta, 597*(2), 179-186. doi:10.1016/j.aca.2007.07.011.

Fisher, R. A. (1992). The arrangement of field experiments. En S. Kotz & N. L. Johnson (Eds.), *Breakthroughs in statistics* (Vol. 2, pp. 82-91). Nueve York, EE. UU.: Springer.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (1998). 4. Costos de producción. Recuperado de http://www.fao.org/docrep/003/v8490s/v8490s06.htm#TopOfPage.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2005). *Manejo integrado de plagas en zonas extensas*. Recuperado de http://www.fao.org/ag/esp/revista/0506sp1.htm.

Foster, J. W., & Katz, E. (1981). Control of actinomycin D biosynthesis in *Streptomyces parvullus*: regulation of tryptophan oxygenase activity. *Journal of Bacteriology, 148*(2), 670-677.

Friesen, T. J., Holloway, G., Hill, G. A., & Pugsley, T. S. (2006). Effect of conditions and protectants on the survival of *Penicillium bilaiae* during storage. *Biocontrol Science and Technology, 16*(1), 89-98. doi:10.1080/09583150500258263.

Gaugler, R., Grewal, P., Kaya, H. K., & Smith-Fiola, D. (2000). Quality assessment of commercially produced entomopathogenic nematodes. *Biological Control, 17*(1), 100-109. doi:10.1006/bcon.1999.0768.

Gervais, P., & Molin, P. (2003). The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal, 13*(2-3), 85-101. doi:10.1016/S1369-703X(02)00122-5.

Glare, T. R., & Moran-Diez, M. E. (2016). *Microbial-Based Biopesticides: Methods and Protocols*. Nueva York, EE. UU.: Springer.

Gómez, M. I., Moreno, C. A., Cotes, A. M., Smith, A., Villamizar, L. F., Beltrán, C., … Uribe. L. A. (2010). *Desarrollo y ajuste de los procesos tecnológicos requeridos para el registro de dos formulaciones a base de Trichoderma koningiopsis (Th003) para los cultivos de tomate (Lycopersicon esculentum) y lechuga (Lactuca sativa)* [Informe técnico final]. Mosquera, Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica).

Gómez, M. I., Díaz, A., & Cruz, F. M. (2011). Escalamiento de la producción del bioplaguicida a base de *Trichoderma koningiopsis* Th003. En M. I. Gómez, & A. M. Santos (Eds.), *Uso de Trichoderma koningiopsis Th003 para el control de fitopatógenos en hortalizas* (pp. 27-42). Bogotá, Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica).

Gómez, J., Guevara, J., Cuartas, P., Espinel, C., & Villamizar, L. (2013). Microencapsulated *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus: insecticidal activity and effect on arthropod populations in maize. *Biocontrol Science and Technology, 23*(7), 829-846. doi:10.1080/09583157.2013.802288.

González, R., Islas, L., Obregón, A. M., Escalante, L., & Sánchez, S. (1995). Gentamicin formation in *Micromonospora purpurea:* stimulatory effect of ammonium. *Journal of Antibiotics, 48*(6), 479-483. doi:10.7164/antibiotics.48.479.

Grijalba Bernal, E. P., Gómez Álvarez, M. I., & Zuluaga Mogollón, M. V. (2014). Compatibilidad *in vitro* de *Isaria fumosorosea* (Wize) Brown y Smith (Hypocreales: *Clavicipitaceae*) con plaguicidas comerciales. *Acta Agronómica, 63*(1), 48-54. doi:10.15446/acag.v63n1.37895.

Grijalba, E. P., Villamizar, L. R., & Cotes, A. M. P. (2009). Evaluation of the stability of *Paecilomyces* sp. and *Beauveria bassiana* under ultraviolet radiation. *Revista Colombiana de Entomología 35*(1), 1-6.

Gupte, M., & Kulkarni, P. (2003). A study of antifungal antibiotic production by *Thermomonospora* sp. MTCC 3340 using full factorial design. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 78*(6), 605-610.

Hallsworth, J., & Magan, N. (1994a). Effects of KCl concentration on accumulation of acyclic sugar alcohols and trehalose in conidia of three entomopathogenic fungi. *Letters in Applied Microbiology, 18*(1), 8-11. doi:10.1111/j.1472-765X.1994.tb00785.x.

Hallsworth, J. E., & Magan, N. (1994b). Effect of carbohydrate type and concentration on polyhydroxy alcohol and trehalose content of conidia of three entomopathogenic fungi. *Microbiology, 140*(10), 2705-2713.

Harada, Y., Sakata, K., Sato, S., & Takayama, S. (2014). Chapter 1. Fermentation Pilot Plant. En C. M. Todaro & H. C. Vogel (Eds.), *Fermentation and Biochemical Engineering Handbook* (3.ª Ed., pp. 3-15). Boston, EE. UU.: William Andrew Publishing.

Harbert, A. P. (2012). *Mind map and demonstration of the quicklook methodology for technology commercialization* (tesis de maestría). University of Texas at Ausin, Texas, United States.

Harman, G., Jin, X., Stasz, T., Peruzzotti, G., Leopold, A., & Taylor, A. (1991). Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum* for biological control. *Biological Control, 1*(1), 23-28. doi:10.1016/1049-9644(91)90097-J.

Hasanain, A. M. (2017). Development of a cheap media for *Bacillus thuringiensis* growth. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering, 3*(6), 216-223. doi:10.25141/2475-3432-2017-6.0216.

Hölker, U., & Lenz, J. (2005). Solid-state fermentation — are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology, 8*(3), 301-306. doi:10.1016/j.mib.2005.04.006.

Huang, X.-F., Chaparro, J. M., Reardon, K. F., Zhang, R., Shen, Q., & Vivanco, J. M. (2014). Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. *Botany, 92*(4), 267-275. doi:10.1139/cjb-2013-0225.

Hubbard, D. W. (1987). Scaleup strategies for bioreactors containing non-Newtonian Broths. *Annals of the New York Academy of Sciences, 506*, 600-607.

Huynh-Ba, K. (2008). *Handbook of stability testing in pharmaceutical development: regulations, methodologies, and best practices*. Nueva York, EE. UU.: Springer Science & Business Media.

Hynes, R. K., & Boyetchko, S. M. (2006). Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. *Soil Biology and Biochemistry, 38*(4), 845-849. doi:10.1016/j.soilbio.2005.07.003.

Ibrahim, L., Butt, T. M., & Jenkinson, P. (2002). Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research, 106*(6), 705-715. doi:10.1017/S0953756202006044.

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (4 de febrero de 2011). *Por medio de la cual se establecen los requisitos para el registro de departamentos técnicos de ensayos de eficacia, productores e importadores de bioinsumos de uso agrícola y se dictan otras disposiciones.* [Resolución 000698 de 2011]. Recuperado de https://www.ica.gov.co/getattachment/225bd110-d1c4-47d7-9cf3-43745201e39a/2011R698.aspx.

Instituto Vasco de Estadística (Eustat). (s. f.). Investigación científica y desarrollo tecnológico (I+D). Recuperado de http://www.eustat.eus/documentos/opt_0/tema_426/elem_1698/definicion.html.

Islam, M. T., & Omar, D. B. (2012). Combined effect of *Beauveria bassiana* with neem on virulence of insect in case of two application approaches. *Journal of Animal & Plant Sciences. 22*(1), 77-82. http://www.thejaps.org.pk/.

Jackson, M. A. (1997). Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 19*(3), 180-187.

Jackson, M. A., & Schisler, D. A. (1992). The composition and attributes of *Colletotrichum truncatum* spores are altered by the nutritional environment. *Applied and Environmental Microbiology, 58*(7), 2260-2265.

Jackson, M. A., Cliquet, S., & Iten, L. B. (2010). Media and fermentation processes for the rapid production of high concentrations of stable blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Biocontrol Science and Technology, 13*(1), 23-33. http://dx.doi.org/10.1080/09583150210000543 68.

Janmaat, A. F., & Myers, J. (2003). Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 270*(1530), 2263-2270. doi:10.1098/rspb.2003.2497.

Jenkins, N. E., & Grzywacz, D. (2000). Quality control of fungal and viral biocontrol agents-assurance of product performance. *Biocontrol Science and Technology, 10*(6), 753-777. doi:10.1080/09583150020011717.

Jenkins, N. E., Heviefo, G., Langewald, J., Cherry, A. J., & Lomer, C. J. (1998). Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News and Information, 19*(1), 21N-31N.

Jin, X., Harman, G. E., & Taylor, A. G. (1991). Conidial biomass and desiccation tolerance of *Trichoderma harzianum* produced at different medium water potentials. *Biological Control, 1*(3), 237-243. doi:10.1016/1049-9644(91)90072-8.

Karnataka, J. (2007). Effect of agrochemicals on growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences, 20*(2), 410-413.

Kennedy, M., & Krouse, D. (1999). Strategies for improving fermentation medium performance: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 23*(6), 456-475.

Keskin Gündoğdu, T., Deniz, İ., Çalışkan, G., Şahin, E. S., & Azbar, N. (2016). Experimental design methods for bioengineering applications. *Critical Reviews in Biotechnology, 36*(2), 368-388. doi:10.3109/07388551.2014.973014.

Kim, C. H., Rao, K. J., Youn, D. J., & Rhee, S. K. (2003). Scale-up of recombinant hirudin production from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering, 8*(5), 303-305. https://link.springer.com/article/10.1007/BF02949222.

Kinay, P., & Yildiz, M. (2008). The shelf life and effectiveness of granular formulations of *Metschnikowia pulcherrima* and *Pichia guilliermondii* yeast isolates that control postharvest decay of citrus fruit. *Biological Control, 45*(3), 433-440. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.03.001.

Kshirsagar, P. R., Suttar, R., Nilegaonkar, S. S., Pradhan, S., & Kanekar, P. P. (2013). Scale up production of polyhydroxyalkanoate (PHA) at different aeration, agitation and controlled dissolved oxygen levels in fermenter using *Halomonas campisalis* MCM B-1027. *Journal of Biochemical Technology, 4*(1), 512-517.

Kubilay, M., & Gökce, A. (2004). Effects of selected pesticides used against glasshouse tomato pests on colony growth and conidial germination of *Paecilomyces fumosoroseus*. *Biological Control, 31*(3), 398-404. doi:10.1016/j.biocontrol.2004.06.001.

Kumar, G., & Ramya, V. (2014). Compatibility of agrochemical with entomopathogenic fungi *Paecilomyces lilacinus*, a biological nematicide. *Journal of Global Biosciences, 3*(2), 406-410.

Kumar, S., Thakur, M., & Rani, A. (2014). Trichoderma: Mass production, formulation, quality control, delivery and its scope in commercialization in India for the management of plant diseases. *African Journal of Agricultural Research, 9*(53), 3838-3852.

Lacey, L. A., Headrick, H. L., & Arthurs, S. P. (2008). Effect of temperature on long-term storage of codling moth granulovirus formulations. *Journal of Economic Entomology, 101*(2), 288-294. doi:10.1603/0022-0493(2008)101[288:EOTOLS]2.0.CO;2.

Lane, B. S., Trinci, A. P. J., & Gillespie, A. T. (1991). Endogenous reserves and survival of blastospores of *Beauveria bassiana* harvested from carbon- and nitrogen-limited batch cultures. *Mycological Research, 95*(7), 821-828. doi:10.1016/S0953-7562(09)80045-2.

Larroche, C., Theodore, M., & Gros, J. B. (1992). Growth and sporulation behaviour of *Penicillium roqueforti* in solid substrate fermentation: effect of the hydric parameters of the medium. *Applied Microbiology and Biotechnology, 38*(2), 183-187. doi:10.1007/BF00174465.

Leland, J. E., Mullins, D. E., Vaughan, L. J., & Warren, H. L. (2005). Effects of media composition on submerged culture spores of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae var. acridum*, Part 1: Comparison of cell wall characteristics and drying stability among three spore types. *Biocontrol Science and Technology, 15*(4), 379-392. doi:10.1080/09583150400016928.

Leymone, J. P. (2016). Los nuevos pasos del Laboratorio Farroupilha Lallemand. *New AG International* (octubre/noviembre), 32-33.

Li, Y.-Q., Song, K., Li, Y.-C., & Chen, J. (2016). Statistical culture-based strategies to enhance chlamydospore production by *Trichoderma harzianum* SH2303 in liquid fermentation. *Journal of Zhejiang University-Science B, 17*(8), 619-627.

Lonsane, B. K., Saucedo-Castaneda, G., Raimbault, M., Roussos, S., Viniegra-Gonzalez, G., Ghildyal, N. P., … Krishnaiaha, M. M. (1992). Scale up strategies for solid state fermentation systems. *Process Biochemistry, 27*(5), 259-273. Recuperado de https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/003295929285011P.

López, M. E., González, N., Osobampo, S., Cano, A., & Gálvez, R. (2013). *Estudio Técnico. Elemento indispen-sable en la evaluación de proyectos de inversión*. Recuperado de http://moodle2.unid.edu.mx/dts_cursos_mdl/lic/ET/EP/S05/EP05_Lectura.pdf.

Marcus, M. S. (2009). *Perspectives and challenges for biopesticide industry*. Ponencai presentada en 4th Annual Biocontrol Industry Meeting (ABIM), Lucerne, Switzerland.

Marín-Cervantes, M. C., Matsumoto, Y., Ramírez-Coutiño, L., Rocha-Pino, Z., Viniegra, G., & Shirai, K. (2008). Effect of moisture content in polyurethane foams as support for solid-substrate fermentation of *Lecanicillium lecanii* on the production profiles of chitinases. *Process Biochemistry, 43*(1), 24-32. doi:10.1016/j.procbio.2007.10.009.

Mark, G. L., Morrissey, J. P., Higgins, P., & O'Gara, F. (2006). Molecular-based strategies to exploit *Pseudomonas* biocontrol strains for environmental biotechnology applications. *FEMS Microbiology Ecology, 56*(2), 167-177.

Márquez, J. (2010). Innovación en modelos de negocio: la metodología de Osterwalder en la práctica. *Revista MBA Eafit, 1*, 30-47.

Marvier, M., McCreedy, C., Regetz, J., & Kareiva, P. (2007). A meta-analysis of effects of Bt cotton and maize on nontarget invertebrates. *Science, 316*(5830), 1475-1477. doi:10.1126/science.1139208.

Mascarin, G. M., Jackson, M. A., Kobori, N. N., Behle, R. W., & Delalibera Júnior, Í. (2015). Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. *Journal of Invertebrathe Pathology, 127*, 11-20. doi:10.1016/j.jip.2014.12.001.

McGaughey, W. H. (1985). Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science, 229*(4709), 193-196.

Mead, R., Curnow, R. N., & Hasted, A. M. (2002). *Statistical methods in agriculture and experimental biology*. Boca Raton, EE. UU.: CRC Press.

Melo, A., Ariza, P., Lissbrant, S., & Tofiño, A. (2015). Evaluación de agroquímicos-bioinsumos para el manejo sostenible del fríjol en la costa Caribe colombiana. *Agronomía Colombiana, 33*(2), 203-211. doi:10.15446/agron.colomb.v33n2.49858.

Miranda, J. J. M. (2005). *El ciclo del proyecto. Gestión de proyectos: identificación, formulación, evaluación financiera-económica-social-ambiental.* Bogotá, Colombia: MM Editores.

Muñiz-Paredes, F., Miranda-Hernández, F., & Loera, O. (2017). Production of conidia by entomopathogenic fungi: from inoculants to final quality tests. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 33*(3), 57. doi:10.1007/s11274-017-2229-2.

Neves, P., Hirose, E., Chujo, P. T., & Moino, A. (2001). Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoidinsecticides. *Neotropical Entomology, 30*(2), 263-268. doi:10.1590/S1519-566X2001000200009.

Nopharatana, M., Howes, T., & Mitchell, D. A. (1998). Modelling fungal growth on surfaces. *Biotechnology Techniques, 12*(4), 313-318. doi:10.1023/A:1008810500243.

Oliveira, C. N., Oliveira, P. M., & Sueki, L. (2003). Compatibility between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and insecticides used in coffee plantations. *Scientia Agricola, 60*(4), 663-667. doi:10.1590/S0103-90162003000400009.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). (2001). *Guidance for industry data submissions on plant protection products and their active substances (Dossier guidance)*. Recuperado de https://www.oecd.org/chemicalsafety/pesticides-biocides/34870180.pdf.

Osterwalder, A. (2004). *The business model ontology: A proposition in a design science approach* (tesis de doctorado). École des Hautes Études Comerciales de l'Université de Lausanne, Lausana, Suiza.

Osterwalder, A., & Pigneur, Y. (2010). *Business model generation: a handbook for visionaries, game changers, and challengers*. New Jersey, EE. UU.: John Wiley & Sons.

Observatorio Virtual de Transferencia Tecnológica (OVTT). (s. f.). *Vigilancia tecnológica e inteligencia.* Recuperado de http://www.ovtt.org/vigilancia-tecnologica.

Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal, 13*(2-3), 81-84. doi:10.1016/S1369-703X(02)00121-3.

Pandey, A., Fernandes, M., & Larroche, C. (Eds.). (2008). *Current developments in solid-state fermentation*. Nueva Delhi, India: Springer.

Paul, B., Paul, S., & Khan, M. A. (2011). A potential economical substrate for large-scale production of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* for caterpillar control. *Biocontrol Science and Technology, 21*(11), 1363-1368. doi:10.1080/09583157.2011.605942.

Pavone, D., Díaz, M., Trujillo, L., & Dorta, B. (2009). A granular formulation of *Nomuraea rileyi* Farlow (Samson) for the control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Interciencia, 34*(2), 130-134. Recuperado de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0378-18442009000200011&script=sci_abstract.

Pavone, D., & Dorta, B. (2010). Efecto de agroquímicos sobre el desarrollo del hongo entomopatógeno *Nomuraea rileyi* y su virulencia sobre *Spodoptera frugiperda. Bioagro, 22*(2), 1-11.

Pest Management Regulatory Agency (PMRA). (1993). *Assessment of the economic benefits of pesticides.* Recuperado de http://publications.gc.ca/collections/Collection/H113-3-18E.pdf.

Pest Management Regulatory Agency (PMRA). (2003). *Efficacy guidelines for plant protection products*. Recuperado de https://goo.gl/r1TkFy.

Petlamul, W., & Prasertsan, P. (2014). Spore production of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* BNBCRC for biocontrol: Response surface optimization of medium using decanter cake from palm oil mill. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 57*(2), 201-208.

Plackett, R. L., & Burman, J. P. (1946). The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika, 33*(4), 305-325. doi:10.1093/biomet/33.4.305.

PMG. (2017). *Mercado de clientes agrícolas y desafío de proveedores y distribuidores*. Recuperado de https://www.pmgchile.com/mercado-de-clientes-agricolas-y-desafio-de-proveedores-y-distribuidores/.

Poopathi, S., Kumar, K. A., Kabilan, L., & Sekar, V. (2002). Development of low-cost media for the culture of mosquito larvicides, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 18*(3), 209-216. doi:10.1023/A:1014937311839.

Posada-Uribe, L. F., Romero-Tabárez, M., & Villegas-Escobar, V. (2015). Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production. *Bioprocess Biosystems Engineering, 38*(10), 1879-1888. doi:10.1007/s00449-015-1428-1.

Qiu, J., Song, F., Qiu, Y., Li, X., & Guan, X. (2013). Optimization of the medium composition of a biphasic production system for mycelial growth and spore production of *Aschersonia placenta* using response surface methodology. *Journal of Invertebrate Pathology, 112*(2), 108-115. doi:10.1016/j.jip.2012.10.010.

Qu, L., Ren, L.-J., & Huang, H. (2013). Scale-up of docosahexaenoic acid production in fed-batch fermentation by *Schizochytrium* sp. based on volumetric oxygen-transfer coefficient. *Biochemical Engineering Journal, 77*(15), 82-87. doi:10.1016/j.bej.2013.05.011.

Quintana-Navarro, A. B. (2010). *Análisis del mercado. Dirección de Marketing*. Recuperado de https://goo.gl/k5kApw.

Ravensberg, W. J. (2011). *A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control of arthropods*. Dordrecht, Holanda: Springer Science & Business Media.

Reichelderfer, C., & Benton, C. (1974). Some genetic aspects of the resistance of *Spodoptera frugiperda* to a nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology, 23*(3), 378-382. doi:10.1016/0022-2011(74)90105-0.

Reyes, Y., Infante, D., García-Borrego, J., Del Pozo, E., Cruz, A., & Martínez, B. (2012). Compatibilidad de *Trichoderma asperellum* Samuels con herbicidas de mayor uso en el cultivo del arroz. *Revista de Protección Vegetal, 27*(1), 45-53.

Ribeiro, L. P., Blume, E., Borgoni, P. C., Dequech, S. T. B., Brand, S. C., & Junges, E. (2012). Compatibility of *Beauveria bassiana* commercial isolate with botanical insecticides utilized in organic crops in southern Brazil. *Biological Agriculture & Horticulture, 28*(4), 223-240. doi: 10.1080/01448765.2012.735088.

Rohrmann, G. F. (2013). *Baculovirus molecular biology*. Corvallis, EE. UU.: Oregon State University.

Romero, D., De Vicente, A., Rakotoaly, R. H., Dufour, S. E., Veening, J. W., Arrebola, E., ... Pérez-García, A. (2007). The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal, 20*(4), 430-440.

Rossi-Zalaf, L. S., Alves, S. B., Lopes, R. B., Silveira, S., & Tanzini, M. R. (2008). Interacao de microrganismos com outros agentes de controle de pragas e doencas. En S. B. Alves & R. B. Lopes (Eds.), *Controle microbiano de pragas na América Latina: avancos e desafios Piracicaba* (pp. 279-302). Piracicaba, Brazil: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ).

Rottenbacher, L., Schossler, M., & Bauer, W. (1987). Modelling a solid-state fluidized bed fermenter for ethanol production with *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioprocess Engineering, 2*(1), 25-31. doi:10.1007/BF00369223.

Ruocco, M., Woo, S., Vinale, F., Lanzuise, S., & Lorito, M. (2011). Identified difficulties and conditions for field success of biocontrol. 2. Technical aspects: factors of efficacy. En P. C. Nicot (Ed.) *Classical and augmentative biological control against diseases and pests: critical status analysis and review of factors* (45-57). Zurich; Suiza: International Organisation for Biological and Integrated Control/West Palaearctic Regional Section (IOBC/WPRS).

Santos, A., García, M., Cotes, A. M., & Villamizar, L. (2012). Efecto de la formulación sobre la vida útil de bioplaguicidas a base de dos aislamientos colombianos de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034. *Revista Iberoamericana de Micología, 29*(3), 150-156. doi:10.1016/j.riam.2011.11.002.

Santos, A., Grijalba, E., Zuluaga, M. V., Gómez, M., & Villamizar, L. (2013). Compatibilidad *in vitro* de un bioplaguicida a base de *Lecanicillium lecanii* (Hypocreales: Clavicipitaceae) con agroquímicos empleados en los cultivos de algodón y berenjena. *Revista Colombiana de Biotecnología, 15*(2), 132-142. doi:10.15446/rev.colomb.biote.v15n2.38025.

Santos, A. M., Uribe, L. A., Ruiz, J. C., Tabima, L., Gómez, J. A., & Villamizar, L. F. (2014). Nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda* SfNPV003: Compatibilidad con agroquímicos y estabilidad en condiciones de almacenamiento. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria, 15*(2), 219-228. Recuperado de http://revista.corpoica.org.co/index.php/revista/article/view/361.

Sauphanor, B., Berling, M., Toubon, F., Reyes, M., Delnatte, J., & Allemoz, P. (2006). Cases of resistance to granulosis virus in the codling moth. *Phytoma*, (590), 24-27.

Samson, P. R., Milner, R. J., Sander, E. D., & Bullard, G. K. (2005). Effect of fungicides and insecticides applied during planting of sugarcane on viability of *Metarhizium anisopliae* and its efficacy against white grubs. *BioControl, 50*(1), 151-163. Recuperado de https://link.springer.com/journal/10526.

Saucedo-Castaneda, G., Lonsane, B. K., Krishnaiah, M. M., Navarro, J. M., Roussos, S., & Raimbault, M. (1992). Maintenance of heat and water balances as a scale-up criterion for the production of ethanol by *Schwanniomyces castellii* in a solid state fermentation system. *Process Biochemistry, 27*(2), 97-107. doi:10.1016/0032-9592(92)80016-V.

Schisler, D., Jackson, M., & Bothast, R. (1991). Influence of nutrition during conidiation of *Colletotrichum truncatum* on conidial germination and efficacy in inciting disease in *Sesbania exaltata*. *Phytopathology, 81*(6), 458-461.

Schmitt, A., Bisutti, I., Ladurner, E., Benuzzi, M., Sauphanor, B., Kienzle, J., ... Huber, J., (2013). The occurrence and distribution of resistance of codling moth to *Cydia pomonella* granulovirus in Europe. *Journal of Applied Entomology, 137*(9), 641-649. doi:10.1111/jen.12046.

Schumacher, V., & Poehling, H. M. (2012). *In vitro* effect of pesticides on the germination, vegetative growth, and conidial production of two strains of *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Biology, 116*(1), 121-132. doi:10.1016/j.funbio.2011.10.007

Shi, Y., Xu, X., & Zhu, Y. (2009). Optimization of *Verticillium lecanii* spore production in solid-state fermentation on sugarcane bagasse. *Applied Microbiology and Biotechnology, 82*(5), 921-927. doi:10.1007/s00253-009-1874-2.

Silman, R. W., Nelsen, T., & Bothast, R. (1991). Comparison of culture methods for production of *Colletotrichum truncatum* spores for use as a mycoherbicide. FEMS *Microbiology Letters, 79*(1), 69-74.

Singh, A., Tatewar, D., Shastri, P., & Pandharipande, S. (2008). Application of ANN for prediction of cellulase and xylanase production by *Trichoderma reesei* under SSF condition. *Indian Journal of Chemical Technology,15*(1) 53-58.

Singh, D., Yadav, D. K., Chaudhary, G., Rana, V. S., & Sharma, R. K. (2016). Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of bacterial wilt of tomato incited by *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Plant Pathology and Microbiology, 7*(1), 2. doi:10.4172/2157-7471.1000327.

Singh, N., Rai, V., & Tripathi, C. K. M. (2012). Production and optimization of oxytetracycline by a new isolate *Streptomyces rimosus* using response surface methodology. *Medicinal Chemistry Research, 21*(19), 3140-3145.

Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., & Tripathi, C. (2016). Strategies for fermentation medium optimization: an in-depth review. *Frontiers in Microbiology, 7*, 2087. doi:10.3389/fmicb.2016.02087

Soberón, M., Gill, S. S., & Bravo, A. (2009). Signaling versus punching hole: how do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cellular and Molecular Life Sciences, 66*(8), 1337-1349. doi:10.1007/s00018-008-8330-9.

Soccol, C., Ayala, L. A., Thomaz-Soccol, V., Krieger, N., & Dos Santos, H. R. (1997). Spore production by entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* from declassified potatoes by solid-state fermentation. *Revista de Microbiología, 28*(Suppl. 1), 34-42.

Sreekumar, G., & Krishnan, S. (2010). Enhanced biomass production study on probiotic *Bacillus subtilis* SK09 by medium optimization using response surface methodology. *African Journal of Biotechnology, 9*(47), 8078-8084. doi:10.5897/AJB10.1283.

Surendran, M., Kannan, G. S., Nayar, K., & Leenakumary, S. (2012). Compatibility of *Pseudomonas fluorescens* with agricultural chemicals. *Journal of Biological Control, 26*(2), 190-193. http://www.informaticsjournals.com/index.php/jbc/article/viewFile/3517/2602.

Tabashnik, B. E. (1994). Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology, 39*, 47-79. doi:10.1146/annurev.en.39.010194.000403.

Thomas, L., Larroche, C., & Pandey, A. (2013). Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal, 81*(15), 146-161. doi:10.1016/j.bej.2013.10.013.

Trakunjae, C., Sukkhum, S., & Kitpreechavanich, V. (2015). Enhanced of high level of β-xylosidase with β-xylanase production by co-culturing of *Bacillus* strains from rice straw using response surface methodology. *Chiang Mai Journal of Science, 42*(4), 822-839.

Tripathi, C. K. M., Praveen, V., Singh, V., & Bihari, V. (2004). Production of antibacterial and antifungal metabolites by *Streptomyces violaceusniger* and media optimization studies for the maximum metabolite production. *Medicinal Chemistry Research, 13*(8), 790-799. doi:10.1007/s00044-004-0118-3.

Tunga, R., Banerjee, R., & Bhattacharyya, B. C. (1998). Optimizing some factors affecting protease production under solid state fermentation. *Bioprocess Engineering, 19*(3), 187-190.

Union, G. B. (2017). *Estrategias del mercado*. Recuperado de http://www.globalbusinessunion.com/spanish/market-strategies.php.

Uribe, L. (2015). *Estudio de la compatibilidad de un bioplaguicida a base de la levadura Rhodotorula glutinis Lv316 con fungicidas empleados en el cultivo de mora* (tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Velásquez, Z., Uribe, D., & Zuluaga, A. (1998). *Fundamentos de medicina: Terapia dermatológica*. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB).

Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., & Valéro, J. R. (2006). Dissolved oxygen as principal parameter for conidia production of biocontrol fungi *Trichoderma viride* in non-Newtonian wastewater. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 33*(11), 941-952. doi:10.1007/s10295-006-0164-6.

Viccini, G., Mannich, M., Capalbo, D. M. F., Valdebenito-Sanhueza, R., & Mitchell, D. A. (2007). Spore production in solid-state fermentation of rice by *Clonostachys rosea*, a biopesticide for gray mold of strawberries. *Process Biochemistry, 42*(2), 275-278. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.07.006.

Villamizar, L., Grijalba, E., & Cotes, A. M. (2006). *Desarrollo de un bioplaguicida para el control de la mosca blanca Bemisia tabaci*. Mosquera, Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica).

Villarreal, Y. L. (2013). *Estudio de estabilidad para la selección de una formulación de un producto probiótico* (tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Wang, D., Cooney, C., Demain, A., Dunnill, P., Humphrey, A., & Lilly, M. (1997). *Translation of laboratory, pilot, and plant scale data. Fermentation and enzyme technology*. Nueva York, EE. UU.: Wiley.

Wang, P., Liu, X., Wang, Y., Ruan, H., & Zheng, X. (2011). Statistical media optimization for the biomass production of postharvest biocontrol yeast *Rhodosporidium paludigenum*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, *41*(4), 382-397. doi:10.1080/10826068.2011.552143.

Wells, J. (2004). Preformulación farmacéutica: propiedades fisicoquímicas de las sustancias farmacológicas. En M. E. Aulton (Ed.), *Farmacia: la ciencia del diseño de las formas farmacéuticas* (pp. 114-139). Madrid, España: Elsevier.

Xu, X., Yu, Y., & Shi, Y. (2011). Evaluation of inert and organic carriers for *Verticillium lecanii* spore production in solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*, *33*(4), 763-768. doi:10.1007/s10529-010-0496-1.

Yadav, A. K., & Chandra, K. (2014). Mass production and quality control of microbial inoculants. *Proceedings of Indian National Science Academy*, *80*(2), 483-489. doi:10.16943/ptinsa/2014/v80i2/5.

Yawalkar, A. A., Heesink, A., Versteeg, G. F., & Pangarkar, V. G. (2002). Gas—liquid mass transfer coefficient in stirred tank reactors. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, *80*(5), 840-848.

Yu, G., Sinclair, J., Hartman, G., & Bertagnolli, B. (2002). Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry*, *34*(7), 955-963. doi:10.1016/S0038-0717(02)00027-5.

Yu, X., Hallett, S., Sheppard, J., & Watson, A. (1997). Application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements for the production of *Colletotrichum coccodes* spores. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *47*(3), 301-305.

Yu, X., Hallett, S. G., Sheppard, J., & Watson, A. K. (1998). Effects of carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio on growth, conidiation, spore germination and efficacy of the potential bioherbicide *Colletotrichum coccodes*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *20*(6), 333-338.

Zhang, J., & Gao, N.-F. (2007). Application of response surface methodology in medium optimization for pyruvic acid production of *Torulopsis glabrata* TP19 in batch fermentation. *Journal of Zhejiang University Science B*, *8*(2), 98-104.

Zhang, J., & Yang, Q. (2015). Optimization of solid-state fermentation conditions for *Trichoderma harzianum* using an orthogonal test. *Genetics and Molecular Research*, *14*(1), 1771-1781. doi:10.4238/2015.March.13.4.

Zhang, W., Zou, H., Jiang, L., Yao, J., Liang, J., & Wang, Q. (2015). Semi-solid state fermentation of food waste for production of *Bacillus thuringiensis* biopesticide. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *20*(6), 1123-1132.

Zhu, Y., Knol, W., Smits, J. P., & Bol, J. (1996). Medium optimization for nuclease P1 production by *Penicillium citrinum* in solid-state fermentation using polyurethane foam as inert carrier. *Enzyme and Microbial Technology*, *18*(2), 108-112. doi:10.1016/0141-0229(95)00082-8.

Zhu, Y., Smits, J. P., Knol, W., & Bol, J. (1994). A novel solid-state fermentation system using polyurethane foam as inert carrier. *Biotechnology Letters*, *16*(6), 643-648. doi:10.1007/BF00128615.

Zhuang, L., Zhou, S., Wang, Y., Liu, Z., & Xu, R. (2011). Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides by solid-state fermentation using wastewater sludge: Effects of heavy metals. *Bioresource Technology*, *102*(7), 4820-4826. doi:10.1016/j.biortech.2010.12.098.

Capítulo 13

Marco regulatorio para el registro de bioplaguicidas

Chapter 13

Regulatory framework for the registration of biopesticides

Adriana Marcela Santos,[1] Liz Alejandra Uribe,[1] Lissette Torres Torres,[1] Ruth Análida Betancourt,[2] Fabiola Moreno,[2] Erika Andrea Alarcón,[1] Martha Isabel Gómez[1]

[1] Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA)

[2] Instituto Colombiano Agropecuario (ICA)

Contenido

Introducción 695

Registro de bioplaguicidas a nivel mundial 695

Registro de bioplaguicidas en Estados Unidos 697

Registro de bioplaguicidas en la Unión Europea 698

Registro de bioplaguicidas en Asia 700

Registro de bioplaguicidas en Colombia 701

- Caso de éxito bioplaguicida Lecabiol® 704

Retos en el registro de bioplaguicidas a base de agentes de control biológico 705

- Unificación de requisitos y del proceso de registro 706
- Costo de registro 706
- Entidades de regulación sin la experiencia en el desarrollo de bioplaguicidas 707
- El desarrollo de productos innovadores requiere de una nueva reglamentación 707

Perspectivas en investigación y su relación con las regulaciones 707

- Avances en los sistemas de producción 708
- Avances en la formulación 708
- Mejoramiento genético de los agentes de control biológico 709
- Uso de microorganismos endófitos 709
- Uso de sustancias bioactivas 710
- Otros aspectos del control biológico 710

Conclusiones 711

Referencias 712

Resumen

Una alternativa para disminuir el uso de plaguicidas de síntesis química son los bioplaguicidas a base de agentes de control biológico (ACB), los cuales han demostrado una alta efectividad, especificidad y ser amigables con el medioambiente. Lo anterior ha hecho que la producción y el mercado de este tipo de bioinsumos aumenten a nivel mundial. Sin embargo, para que la comercialización de estos bioinsumos sea posible, es necesario desarrollar un sistema de regulación, evaluación y registro que sea accesible para la industria y que brinde seguridad y respaldo al usuario (el agricultor). En este capítulo se ofrece un acercamiento al estado actual de la regulación nacional e internacional y una perspectiva de los avances y necesidades en este tema. Es claro que el avance del control biológico mediante la búsqueda de nuevos microorganismos, nuevas formulaciones y nuevas estrategias de implementación debe ir acompañado de nuevas regulaciones que sean simples, accesibles y armonizadas a nivel mundial.

Palabras clave

Armonización, bioplaguicidas, registro, regulación

Abstract

An alternative to reduce the use of chemical pesticides are biopesticides based on biological control agents (BCA), which have shown highly effective, target specificity and eco-friendly status. Because of that, biopesticide production and market has increased worldwide. However, for the commercialization of these biopesticides, it is necessary to develop a regulation, risk assessment and registration system. This system must be accessible to the industry and must provide security and support to the final consumer. In this chapter, the current status of regulation biopesticides in worldwide and in Colombia is introduced, including future innovations and needs for the registration management of biopesticides. Evidently, biopesticide progress must be accompanied by accessible, simple and harmonized regulations at global level.

Keywords

Biopesticide, harmonization, registration, regulation

Introducción

El aumento en la producción mundial de alimentos, la necesidad de productos orgánicos en el mercado internacional y la creciente resistencia de insectos plaga y fitopatógenos a plaguicidas de síntesis química han incrementado la demanda y el uso de bioplaguicidas a base de agentes de microorganismos de manera importante e impactante (Keswani, Sarma, & Singh, 2016). De hecho, se estima que el mercado global de bioplaguicidas puede alcanzar el valor de US$78,7 billones para el año 2021, con un crecimiento del 18,8 % entre 2015 y 2020 (Research and Markets, 2017).

La adopción de estos productos se ha venido llevando a cabo como parte de las prácticas de manejo integrado de insectos plaga y de enfermedades (MIP) y de la búsqueda de soluciones amigables con el medioambiente. Ejemplo de lo anterior es la cantidad de bioplaguicidas, bioherbicidas y bionematicidas que se ha registrado a nivel mundial (Keswani et al., 2016). Sin embargo, la adopción de este tipo de estrategias depende de la consistencia de los resultados en condiciones de campo y de la mejora de las características propias del bioproducto, como la estabilidad en condiciones de almacenamiento y la actividad biológica.

Es necesario, por tanto, aumentar la seguridad del usuario final mediante la exigencia de los requerimientos legales de registro, cuyo cumplimiento está orientado a proteger la salud humana, los organismos que no son blanco del producto y el medioambiente (Desai, Kumar, Amalraj, Talluri, & Peter, 2016). En efecto, internacionalmente se ha promovido la creación de comités e instituciones que establezcan y supervisen la reglamentación de los bioinsumos. Estos entes reguladores formulan y actualizan los requisitos de registro, con base en las necesidades locales e internacionales (Braverman, Kunkel, & Baron, 2014). Además, la generación de requerimientos legales consistentes y estrictos pero fáciles de usar garantiza la disponibilidad de bioproductos con características microbiológicas, fisicoquímicas y biológicas definidas, lo que se traduce en productos con resultados exitosos en el mercado (African Agricultural Technology Foundation [AATF], 2013).

Registro de bioplaguicidas a nivel mundial

Los agentes de control biológico (ACB) de insectos plaga y de fitopatógenos formulados como bioplaguicidas, al igual que los plaguicidas de síntesis química, están sujetos al proceso de registro ante las autoridades competentes. Este proceso de registro evalúa los riesgos asociados al principio activo (bacteria, hongo o virus, en el caso de los ACB) y al producto formulado para la salud humana y animal y para el medioambiente. La autoridad reguladora realiza una evaluación del riesgo con base en el expediente o dosier del producto presentado por el solicitante. Después de esta evaluación, se emite un concepto que incluye las recomendaciones legales, los riesgos especiales y las precauciones de seguridad. La generación del expediente y la solicitud de registro frente al ente regulatorio constituyen gran parte de la inversión económica para el desarrollo de un bioplaguicida. Debido a esto, el proceso de registro es, sin duda, la mayor barrera para la comercialización de bioplaguicidas a nivel mundial (figura 13.1) (Ravensberg, 2011).

El proceso de registro siempre ha sido objeto de debate, especialmente, por la necesidad de la armonización de los requisitos, la evaluación de riesgos (lo que incluye los ensayos toxicológicos), los procedimientos administrativos y los costos (AATF, 2013; Keswani et al., 2016; Ravensberg, 2011). Las principales dificultades de este proceso son las siguientes:

- Los requisitos no están bien definidos y a menudo lo que se hace es adaptar los requisitos de plaguicidas de síntesis química a los ACB, lo cual no resulta apropiado.

- Los métodos de control de calidad y de ensayo no están establecidos de manera homogénea. En algunas ocasiones, el desarrollo de estos depende del productor mismo.
- Los indicadores de las evaluaciones de riesgo y, en especial, los ensayos toxicológicos no están definidos, lo que permite interpretaciones diferentes entre el productor y el ente regulador.
- Los procedimientos de registro son largos y costosos.
- No existe un tiempo estimado para el retorno de la inversión por ventas.

En general, los requerimientos de registro se basan en la identificación y clasificación del microorganismo biocontrolador. De acuerdo con ello, se establece el uso y la descripción de metodologías apropiadas para el aislamiento, la cuantificación del microorganismo y la determinación de metabolitos o componentes químicos específicos. Es necesario, además, brindar información referente a la distribución geográfica de los hospederos, los hábitats, los nichos ecológicos, el nivel de ocurrencia natural en el medioambiente y su estabilidad genética (Desai et al., 2016; Ravensberg, 2011).

En cuanto al proceso de manufactura, se considera necesario que las diferentes operaciones estén claramente definidas, con un énfasis particular en los puntos críticos y en las medidas adoptadas para garantizar una calidad constante y evitar la contaminación tanto química como biológica, la cual debe ser monitoreada durante el proceso (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos [OECD], 2003). Además, las metodologías empleadas para

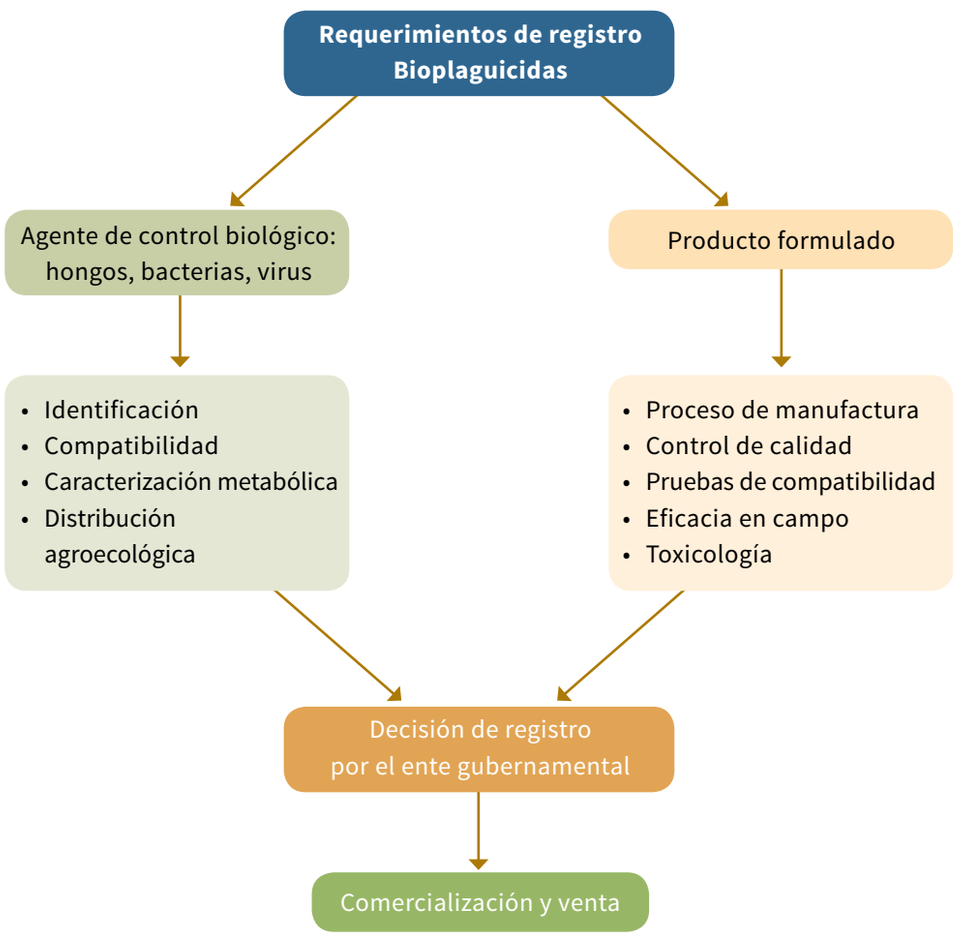


Figura 13.1. Requerimientos generales para el registro de bioplaguicidas a nivel mundial.

Fuente: Elaboración propia

verificar esta actividad deben ser descritas en detalle, lo cual incluye la estandarización, sensibilidad, reproducibilidad y la validez estadística (AATF, 2013; Desai et al., 2016; Keswani et al., 2016; Ravensberg, 2011).

Finalmente, la parte más extensa y costosa de las exigencias para el registro de bioplaguicidas son los estudios toxicológicos. Estos pretenden predecir los efectos adversos del uso expresados en términos de infectividad, patogenicidad, toxicidad e hipersensibilidad sobre grupos de organismos a los que no va dirigido el bioplaguicida —mamíferos, pájaros, peces, artrópodos, invertebrados acuáticos, microorganismos y plantas— (Desai et al., 2016; Pest Management Regulatory Agency [PMRA], 2001).

Todos los requerimientos anteriores han sido implementados por los entes regulatorios de los países con mayor impacto en el mercado de bioplaguicidas; no obstante, con el fin de conseguir una apertura económica y un uso generalizado de estos bioproductos, es necesario implementar procesos de registro armonizados, fáciles de realizar y que sean aplicables a nivel mundial (Desai et al., 2016). Lo anterior generará un aumento en el número de bioplaguicidas registrados a nivel mundial (figura 13.2).

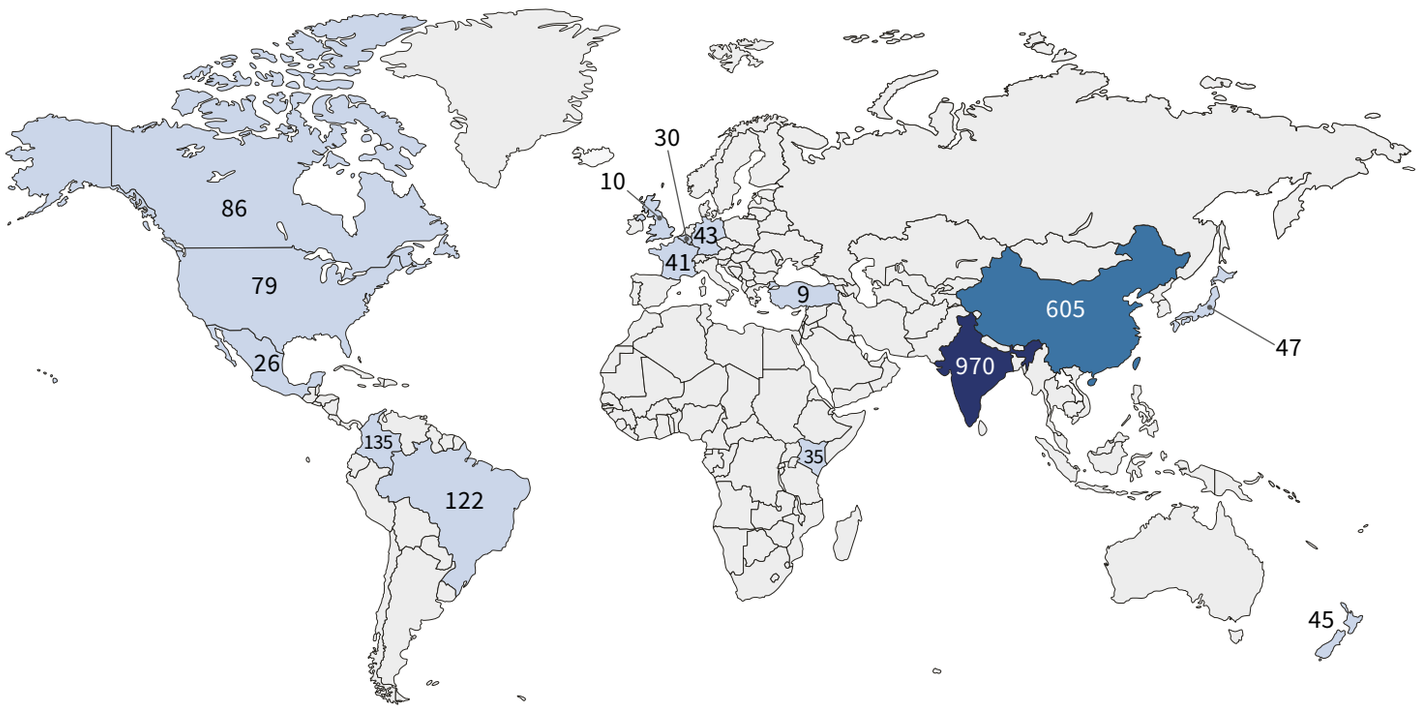


Figura 13.2. Número de bioplaguicidas registrados a nivel mundial.

Fuente: Elaboración propia con datos de Agriculture and Agri-Food Canada (2013)

Registro de bioplaguicidas en Estados Unidos

En los Estados Unidos, el portafolio de bioplaguicidas registrados por principios activos comprende cerca de 400 productos (Balog, Hartel, Loxdale, & Wilson, 2017). En este país, la Ley Federal de Insecticidas, Fungicidas y Raticidas (FIFRA, por sus iniciales en inglés) considera los bioplaguicidas a base de microorganismos y sustancias bioquímicas como plaguicidas de uso común, los cuales deben ser registrados ante la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, por sus iniciales en inglés). La EPA se encarga de evaluar el bioplaguicida a comercializar con el fin de asegurar que su uso no represente un riesgo para la salud humana y el medioambiente. Lo anterior requiere una revisión exhaustiva de la seguridad

ambiental, especialmente, del ingrediente activo, además de conocer el cultivo en el que se va a aplicar el bioplaguicida, la cantidad, la frecuencia de uso, el almacenamiento y las instrucciones de eliminación e inactivación del producto (Sansinenea, 2016).

Así, pues, en Estados Unidos un bioplaguicida no puede ser legalmente usado, vendido o distribuido si no ha sido registrado en la oficina de EPA. En efecto, entre los años 2000 y 2015 se propusieron cuatro reglamentos federales, conocidos como la autorización de bioplaguicidas dentro del Código de Regulaciones Federales (CFR). Además, durante el mismo periodo de tiempo se adoptaron otras 20 leyes federales de importancia e impacto en la protección y sostenibilidad ambiental relacionadas con el uso de bioplaguicidas (Balog et al., 2017), lo cual ha ocasionado una alta y estricta regulación para este tipo de bioproductos.

Los requerimientos para registro de bioplaguicidas están establecidos en el Código de Regulaciones Federales (40 CFR), parte 158, subparte V: "Plaguicidas microbianos" (numeral 158.2100). Además, la EPA ha publicado una guía para uso y consulta con las diferentes pruebas para plaguicidas microbianos conocida como OSCPP Serie 885 (Braverman et al., 2014; Leahy, Mendelsohn, Kough, Jones, & Berckes, 2014). Estas regulaciones permiten una flexibilidad con respecto a los requerimientos solicitados: si no se puede entregar la información que se solicita, se puede justificar una prueba alternativa y las razones científicas que la respaldan. No obstante, la agencia tiene la potestad de solicitar pruebas adicionales si ha identificado un riesgo potencial en el bioplaguicida en estudio. Este enfoque flexible asegura que los riesgos potenciales que puedan presentar los bioplaguicidas sean evaluados de una manera correcta y ágil (Leahy et al., 2014).

Dado que los bioplaguicidas son menos tóxicos que los plaguicidas convencionales, el proceso de registro y la información solicitada para aquellos es inferior a la requerida para estos, por lo tanto, el tiempo de solicitud y obtención de registro es significativamente inferior. Por ejemplo, el registro de un bioplaguicida cuyo ingrediente activo haya sido registrado previamente puede costar unos US$6.079 y requerir un tiempo de siete meses, y el registro de un bioplaguicida con un ingrediente activo nunca registrado puede requerir hasta 19 meses con un costo promedio de US$48.621. En cambio, la solicitud de registro de un plaguicida de síntesis química puede demorarse hasta 24 meses con un costo aproximado de US$590.000 (Leahy et al., 2014).

En general, la EPA se enfoca en evaluar todos los riesgos asociados al agente de control biológico, el cual debe ser completamente identificado y caracterizado. Además, el solicitante del registro debe entregar toda la información bibliográfica que facilite la revisión de posibles problemas en relación con la salud humana y animal y con el medioambiente. Cualquier efecto adverso conocido del microorganismo, como toxinas y posible patogenicidad en especies diferentes al organismo que se pretende atacar, debe ser reportado (Leahy et al., 2014; Matthews, 2014).

Con respecto a la evaluación de la eficacia del producto, se deben desarrollar las pruebas en condiciones de campo y de laboratorio. Sin embargo, estas no se requieren al momento de solicitud del registro, salvo que sean expresamente solicitadas por la EPA o porque correspondan a un insecto plaga o a un fitopatógeno que afecta la salud pública (Leahy et al., 2014).

En síntesis, además de los requerimientos básicos de producción, como el proceso de manufactura, el control de calidad y la estabilidad del producto en almacenamiento, los requerimientos de registro establecidos en los Estados Unidos se enfocan en la evaluación de la toxicidad sobre mamíferos y en evitar perjuicios sobre la salud humana, animal y el medioambiente.

Registro de bioplaguicidas en la Unión Europea

En la Unión Europea (UE), a diferencia de Estados Unidos, los bioplaguicidas son categorizados como productos fitosanitarios, que contienen agentes de control biológico para uso agrícola y hortícola. En consecuencia, para poder incluir estos productos biológicos dentro de estrategias de manejo integrado,

deben estar previamente registrados y avalados por entes reguladores acreditados.

Es importante tener en cuenta que para hacer la solicitud de registro en la Unión Europea se deben conocer claramente los mecanismos de acción del ingrediente activo empleado y la influencia que pueden ejercer sobre el medioambiente, así como garantizar que tengan un efecto directo sobre el insecto plaga o el fitopatógeno que se quiere atacar. Es indispensable tener una comprensión profunda de estos aspectos, antes de hacer la solicitud de registro de un producto biológico, dado que el marco reglamentario para el registro de bioplaguicidas busca excluir cualquier ingrediente activo que signifique un riesgo para la salud de los seres humanos o para los organismos que no son objetivo del ataque (Weidenauer, 2015).

El marco regulador aplicado por la UE para el registro de productos fitosanitarios es similar al que es aplicado para las sustancias químicas activas; a diferencia de Estados Unidos, donde se creó un marco regulatorio diferente para el registro y la comercialización de bioplaguicidas (tabla 13.1) (Huber, s. f.; Weidenauer, 2015). Estos marcos corresponden a la (EC) N.° 1107/2009 (European Union, 2009) "... para la comercialización de productos fitosanitarios y por la que se derogan las Directivas" y la (EC) N.° 283/2013 que determina los requisitos en materia de datos para las sustancias activas (Weidenauer, 2015).

Tabla 13.1. Diferencias entre Estados Unidos y la Unión Europea en el marco regulatorio para el registro de bioplaguicidas

Elemento	Unión Europea	Estados Unidos
Marco regulatorio	Regulación (EC) N.° 1107/2009 Regulación (EC) N.° 283/2013	40 CFR, Parte 158
Directriz	No disponible	Serie de directrices de pruebas armonizadas 885
Legislación	Legislación de pesticidas químicos con algunas especificaciones para bioplaguicidas	Una legislación creada para bioplaguicidas
Autoridades regulatorias	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria Miembro estatal de productores autorizados Estados miembros de referencia	Agencia de Protección Ambiental (EPA)
Duración del registro	10-15 años	10 años
Inconvenientes	• Inconvenientes en encontrar el estado miembro que actúe como referente • Registro en múltiples países • La información solicitada por ingrediente activo es más extensa • Costos más altos • Sistema de aprobación lento	• Escasa disponibilidad de la información regulatoria • Solo un ente regulatorio
Periodo de aprobación del registro	Al menos cuatro años (similar al tiempo requerido para el registro de pesticidas químicos)	Menos de un año
Número de bioplaguicidas registrados a 2015	Alrededor de 100: 40 microorganismos, 30 feromonas y semioquímicos, 25 extractos de plantas y otros	Más de 430 bioplaguicidas

Fuente: Weidenauer (2015)

El objetivo del marco regulatorio N.° 1107/2009 es garantizar un alto grado de protección de la salud humana y animal y del medioambiente, además de salvaguardar la competitividad de la agricultura comunitaria. Puesto que hacer uso de una sustancia biológica no quiere decir que se esté operando con un material inofensivo, este marco se enfoca en la protección de grupos vulnerables de población, como mujeres embarazadas, lactantes y niños. Por consiguiente, le exige a la industria demostrar que las sustancias o bioplaguicidas producidos o comercializados no tengan efectos nocivos para la salud humana o animal, ni efectos perjudiciales para el medioambiente (Czaja et al., 2015).

En el marco (EC) N.° 283 de 2013 se modificaron los requisitos relacionados con la información requerida del ingrediente activo, debido a la enorme variedad de sustancias que actualmente pueden ser empleadas. Esta modificación se realizó con el fin de adaptar la reglamentación a los actuales conocimientos científicos y técnicos (Huber, s. f.), lo cual permite que los ingredientes activos clasificados como de bajo riesgo puedan ser autorizados por un periodo de hasta 15 años. Además, la obtención del registro de estas sustancias puede durar alrededor de 120 días, tiempo inferior a los 12 meses que puede demorar la obtención del registro de un material cuyo ingrediente activo sea clasificado de alto riesgo (Huber, s. f.).

Dentro de los ingredientes activos que actualmente se emplean para el desarrollo de bioplaguicidas se encuentran los siguientes: extractos obtenidos a partir de diversas variedades de plantas; microorganismos tales como bacterias, mohos, levaduras y virus; nematodos y feromonas, entre otros. Estas sustancias pueden ser clasificadas como de alto o bajo riesgo, según los criterios que se encuentran enumerados en el Anexo II del Reglamento 1107/2009 (Huber, s. f.).

En resumen, Estados Unidos creó un marco reglamentario para el desarrollo y registro de bioplaguicidas, mientras que Europa incluyó la legalización de estos en el marco reglamentario ya existente para los plaguicidas químicos. Lo anterior, junto con la escasa disponibilidad de documentos o guías para el registro de productos biológicos, ha causado que el número de bioproductos registrados en la UE sea menor al de los registrados en Estados Unidos (véase la tabla 13.1). Además, el número de datos requeridos por la UE es mayor al de Estados Unidos, lo que genera más gastos y, a su vez, un mayor tiempo para la expedición de los registros.

Registro de bioplaguicidas en Asia

India y Tailandia son los países asiáticos que han tenido un progreso significativo en la promoción de la producción local y en el uso y registro de bioplaguicidas, mediante la incorporación de microorganismos nativos (hongos, bacterias, virus y nematodos) y de enemigos naturales (parasitoides y depredadores) en estrategias de protección de cultivos. Institutos locales de investigación, servicios de extensión, compañías y organizaciones no gubernamentales han jugado un papel muy importante en el desarrollo y promoción de tecnologías innovadoras y seguras dentro de programas de manejo integrado de plagas, lo cual, sumado a un ambiente regulatorio flexible, ha favorecido la adopción de bioplaguicidas (Grzywacz, 2003).

En India, el Central Insecticides Board and Registration Committee (CIBRC) es el ente que asesora al gobierno central y a los gobiernos estatales en el registro de plaguicidas seguros, eficaces y de calidad para uso doméstico y de exportación. Para ello, establece los procedimientos, directrices y requisitos, con base en la Ley de Insecticidas de 1968 —secciones 9(3) y 9(3B) para el caso particular de bioplaguicidas— y las Reglas Insecticidas de 1971. Actualmente, existen 970 productos registrados ante el CIBRC correspondientes a baculovirus —como el virus de la poliedrosis nuclear (NPV) y el virus de la granulosis (GV)—, hongos, bacterias antagonistas y entomopatógenas, bioplaguicidas botánicos (extractos vegetales) y feromonas de insectos (CIBRC, 2017). Los agentes microbianos incluyen cerca de 57 cepas diferentes, dentro de las cuales se encuentran principios activos a base de las siguientes especies: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Beauveria bassiana*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum*, *Lecanicillium lecanii*, *Metarhizium anisopliae*,

Paecilomyces lilacinus, NPV de *Spodoptera litura* (NPV-S) y NPV de *Helicoverpa armigera* (HaNPV) (CIBRC, 2017).

Por otra parte, expertos de los estados miembros de la Association of Southeast Asian Nations (ASEAN) se reunieron en 2013 para presentar sus experiencias en relación con la regulación de los ACB utilizados contra las principales plagas de cultivos importantes como arroz, hortalizas y frutas. El objetivo principal de esta reunión fue incentivar el uso de dichos ACB en los agricultores dentro de un entorno normativo adecuado que favoreciera a las pequeñas y medianas empresas productoras de bioplaguicidas (Lim et al., 2014).

A partir de dicho encuentro se determinaron unas directrices unificadas sobre la reglamentación, uso y comercialización de los ACB en el sudeste asiático, las cuales son coherentes en gran medida con las establecidas por la Food and Agriculture Organization (FAO). Como primera medida, y con fines prácticos, los ACB se agruparon en cuatro categorías: agentes microbianos de control, los macroorganismos, los semioquímicos (principalmente feromonas, kairomonas, etc.) y los productos naturales (extractos vegetales y productos de fermentación, entre otros) (FAO, 2013). Por otra parte, se definieron los requisitos para el registro de bioplaguicidas, los cuales incluyeron parámetros de caracterización biológica y química de la formulación, de bioeficacia, toxicidad, procesamiento, embalaje, etiquetado, producción y manejo de residuos, y de exposición humana y ambiental (Bateman & Bycroft, 2000).

Dentro de los pasos establecidos por la AMS (ASEAN Member States) para el registro de un bioplaguicida, se encuentran los siguientes:

1. Reunión de prerregistro (orientación mutua entre el solicitante y el ente regulador)
2. Diligenciamiento del formulario de aplicación
3. Reconocimiento del caso
4. Lista de chequeo para el cumplimiento de la documentación requerida
5. Evaluación técnica y científica
6. Evaluación y manejo del riesgo
7. Preparación de contenidos y conclusiones
8. Decisión de registro
9. Publicación y divulgación de la decisión de registro

Los pasos anteriores reflejan en gran parte las directrices de la FAO sobre el registro de los bioplaguicidas (FAO, 2013). De acuerdo con la AMS, se comienza con la presentación de un expediente de registro, seguido por la evaluación por parte de la autoridad reguladora, y se termina con la decisión del órgano regulador sobre si se otorga o no el registro (y el permiso de venta). El registro puede ser incondicional o condicional, por lo cual, en el último caso, pueden requerirse datos adicionales, estudios o medidas por parte del solicitante. El proceso se concluye con la emisión de un certificado de registro, junto con la etiqueta aprobada que lleva un número de identificación único. El registro otorgado tiene un periodo de validez, tras cuya finalización se podrá conceder un nuevo registro al solicitante original, después de la revisión de la documentación presentada para la primera vez y de la generada para la renovación.

Una vez que se ha completado el registro y se ha emitido un certificado, se deben establecer procesos para supervisar el cumplimiento de los requisitos por parte del solicitante en cuanto a las especificaciones estipuladas en los documentos de registro y a la información que debe aparecer en la etiqueta del producto. Así mismo, se deben determinar los métodos y la frecuencia de los controles para el cumplimiento de las especificaciones del bioplaguicida por parte de especialistas idóneos. A partir de octubre de 2013, se cuenta con 471 productos registrados y disponibles en la ASEAN (tabla 13.2) (Lim et al., 2014).

Registro de bioplaguicidas en Colombia

Colombia tiene una larga tradición en el control biológico de insectos plaga y de fitopatógenos. La iniciativa de uso de ACB se inició en la década de los sesenta con la importación desde Estados Unidos de un bioplaguicida a base de baculovirus para el control de *Trichoplusia ni* (Tn6V) y de *Heliothis* spp. (HzSNPV) en cultivos de algodón. En 1982, las empresas de flores iniciaron la producción masiva del

Tabla 13.2. Número de bioproductos registrados y disponibles en varios países de Asia

Agente de control biológico	Indonesia	Laos	Malasia	Filipinas	Singapur	Tailandia	Vietnam	Total
Atrayente	9						9	18
Botánico	16	1	8		3	2	60	90
Promotor de crecimiento		2					47	49
Microbiano	31	6	35	9	7	23	62	173
Producto natural		2	2		1		79	84
Otro	1	7				1		9
Mezcla de productos	4	3	1				39	47
Semioquímico	1							1
Gran total	62	21	46	9	11	26	296	471

Fuente: Lim et al. (2014)

hongo *Trichoderma* spp. para el control de *Fusarium oxysporum* en cultivos de clavel; y más tarde, en los años noventa, se promovió la producción y uso de *Beauveria bassiana* para controlar el barrenador *Hypothenemus hampei* en el cultivo del café (Cotes, 2011). Estos avances en el uso de ACB promovieron de manera significativa el desarrollo de normativas y de marcos legales para la producción y el uso de este tipo de bioproductos (tabla 13.3).

En Colombia, el ente regulador es el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), el cual es responsable del control técnico de las empresas que ejercen las actividades de producción, importación y comercialización de los bioinsumos de uso agrícola, y de establecer los requerimientos para el registro de estos productos (Zambrano Moreno, Bonilla Buitrago, Avellaneda, & Zambrano, 2015). El ICA, mediante la Resolución 3079 de 1995, acogió el término *bioinsumos*; estableció las disposiciones para la industria, comercio y aplicación de estos; y definió, entre otros, los términos *parasitoides* y *entomopatógenos* y, por primera vez, incluyó la definición de *extracto de plantas*.

La implementación del término *bioinsumos* de manera normativa permitió que en 2004 se estableciera la Resolución 375 del 27 de febrero de 2004, una norma nacional que dicta las disposiciones sobre el registro y control de bioinsumos y extractos vegetales de uso agrícola en Colombia (ICA, 2004). Dicha norma describe a los bioinsumos como "producto de origen biológico utilizado con fines de nutrición vegetal, manejo integrado de plagas o mejoramiento de las características biológicas del suelo. Incluye agentes biológicos para el control de plagas, bioabono, inoculantes microbiales para compostaje y productos bioquímicos" e incluye, además, los extractos vegetales. Esta es la primera normativa que dictamina específicamente los requerimientos y definiciones para los bioinsumos de uso agrícola y presenta reglas ajustadas al origen y modo de acción de estos. Es también la primera que tiene en cuenta las diferencias entre los insumos químicos y los biológicos.

Recientemente, la Resolución 698 de 2011 promulgó los requisitos para el registro y control de bioinsumos e incluyó los microorganismos modificados genéticamente, los cuales habían sido excluidos de la normatividad anterior. Esta resolución introdujo el término *bioinsumo de uso agrícola*, que ha servido para marcar una diferencia entre estos y los insumos agrícolas de síntesis química, así como para establecer

requerimientos y consideraciones especiales dada la condición de origen biológico de los primeros.

Para obtener el registro de un bioinsumo de uso agrícola, se debe contar primero con el registro como importador o productor ante el ICA. Posteriormente, se debe solicitar el registro de bioinsumo de interés, para lo cual, el solicitante debe entregar la siguiente documentación (ICA, 2011):

- Certificación de la entrega del material de referencia en Laboratorio Nacional de Insumos Agrícolas (Lania), que hace parte del ICA.
- Concepto toxicológico emitido por el Ministerio de Salud.
- Proyecto de rotulado teniendo en cuenta la Norma Técnica Colombiana (NTC) 4612.
- Prueba de estabilidad del producto realizada por un laboratorio registrado ante el ICA y bioensayo realizado en un blanco biológico para determinar su actividad.
- Informe de la prueba de eficacia agronómica desarrollada en dos lotes de un cultivo para el blanco biológico.

Luego de cumplidos los requisitos que acompañan la solicitud de registro de venta, el ICA emite la resolución que contiene el número de registro del producto, lo cual confiere el aval de comercialización para el uso registrado dentro del territorio colombiano.

Foto: Banco de fotos AGROSAVIA

Figura 13.3. Lecabiol® es un granulado dispersable para el control de mosca blanca.

Tabla 13.3. Marco regulatorio para el registro de bioplaguicidas en Colombia

Elemento	Colombia
Marco regulatorio	Resolución 698 de 2011
Autoridades regulatorias	Instituto Colombiano Agropecuario (ICA)
Duración del registro	Diez años (renovables)
Inconvenientes	✦ Concepto toxicológico ✦ El laboratorio de control de calidad debe estar registrado ante el ICA
Periodo para la aprobación del registro	Al menos cuatro años (similar al tiempo requerido para el registro de plaguicidas químicos)
Costo aproximado	US$4.000 (solamente proceso de registro)
Número de bioplaguicidas registrados a octubre de 2017	Alrededor de 245: 135 agentes microbianos, 61 inoculantes biológicos, 28 extractos vegetales y 21 productos bioquímicos

Fuente: Elaboración propia con datos del ICA (s. f.)

De acuerdo con los requisitos, es posible que el tiempo de obtención de un registro abarque entre dos y cuatro años. De hecho, para los bioplaguicidas resulta difícil la obtención del certificado toxicológico, ya que los entes reguladores que lo emiten no identifican los bioinsumos como de origen biológico, sino que los clasifican como un plaguicida, sin distinción alguna (figura 13.3) (ver " Caso de éxito Lecabiol® ").

A pesar de lo anterior, en los últimos años se ha incrementado en Colombia el registro de empresas y de bioproductos y, por lo tanto, el uso de este tipo de alternativas en el agro colombiano (tabla 13.3). Según Zambrano et al. (2015), en Colombia cerca del 46,7 % de las empresas especializadas en bioinsumos están registradas para la producción de agentes biológicos para el control de plagas, seguidas por las empresas productoras de inoculantes biológicos (26,7 %), las empresas productoras de extractos vegetales (19,1 %) y las de productos bioquímicos (7,5 %).

El comportamiento del registro en Colombia se asemeja a lo reportado por Leng, Zhang, Pan, & Zhao (2011), quienes informan que, en la etapa inicial de regulación, pocos bioplaguicidas se registraron en los países desarrollados, pero luego, esto se incrementó considerablemente, por ejemplo en Estados Unidos solo se registraron 16 en 1996, mientras que a finales de 2003 se habían registrado 1.090 productos.

El marco normativo del registro de bioinsumos de uso agrícola en Colombia denota la trayectoria de su producción en el país y su importancia dentro las prácticas convencionales de la producción agrícola. Hay que tener en cuenta también que la normalización de los productos obedece a factores de mercado y de inocuidad agrícola, lo cual se evidencia en el gran consumo de estos insumos en los campos colombianos. Las autoridades regulatorias exigen que se garantice la calidad y eficiencia que estos ofrecen al consumidor final y que su aplicación no lleve a la propagación de otras plagas agrícolas.

Los cambios regulatorios evidencian, entonces, la evolución del mercado y del estado científico de los productos, tanto así, que la norma vigente se encuentra en un proceso de actualización para incluir nuevos ingredientes, formulaciones y formas de acción, así como para ajustarse a los parámetros internacionales. De esta forma, se espera que la producción nacional encuentre apoyo en el gobierno para mantenerse a la vanguardia respecto al avance de la ciencia y de la industria.

Foto: Banco de fotos AGROSAVIA

Figura 13.4. Presentación del bioinsecticida Lecabiol®.

Caso de éxito bioplaguicida Lecabiol®

Lecabiol® es un bioinsecticida a base de la cepa Vl026 del hongo entomopatógeno *Lecanicillium lecanii*, formulado como un granulado dispersable para el control de mosca blanca (*Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum*) (figura 13.4).

Lecanicillium lecanii inicia su proceso infectivo en los insectos hospederos cuando sus conidios viables son retenidos por contacto en la superficie del integumento, mientras encuentran un espacio propicio para establecer la asociación patógeno-hospedero y formar los tubos germinales que facilitan la invasión del hongo (Pucheta Díaz, Flores Macías, Rodríguez Navarro, & De la Torre, 2006).

El desarrollo del Lecabiol® se inició en 1996, con el aislamiento de la cepa Vl026 a partir de adultos de *Trialeurodes vaporariorum* recolectados en la región del Sumapaz, del departamento de Cundinamarca, Colombia (García-González, 1996). El proceso continuó con las etapas de desarrollo del medio de producción masiva, el desarrollo de prototipos y la determinación de la eficacia en invernadero y campo.

Después, vino la fase de escalamiento y ajuste, para finalmente llegar a la fase de registro.

En el año 2011 se inició la fase de registro, para la cual, inicialmente se solicitó el registro de marca ante la Superintendencia de Industria y Comercio (SIC) en junio. Para diciembre del mismo año fue concedido dicho registro mediante la Resolución 78790 del 29 de diciembre de 2011. Posteriormente, en abril de 2013, se solicitó el concepto toxicológico ante el Instituto Nacional de Salud (INS), que fue emitido con categoría II, altamente tóxico, mediante Resolución 0415 del 19 de mayo de 2014. Dicha categoría fue asignada porque el granulado tenía un alto contenido de partículas finas que provocaron efectos no deseados en la prueba de toxicidad inhalatoria en ratones. Esta complicación requirió de una optimización del proceso de fabricación del granulado, una vez hecha, se solicitó por segunda vez la emisión del concepto toxicológico en septiembre de 2015. Finalmente, mediante la Resolución 1505 del 18 de diciembre de 2015, se obtuvo la categoría toxicológica de ligeramente peligroso.

Con respecto a la aprobación del protocolo de la prueba de eficacia, el trámite se radicó en el ICA y se recibió respuesta en el mes de julio de 2013. Las pruebas en las dos localidades se realizaron durante el segundo semestre de ese mismo año, en los municipios de Agustín Codazzi y San Diego, ubicados en el departamento del Cesar. Estas pruebas lograron una eficacia del 89,9 %, con una dosis de aplicación de 1 g/L^{-1} con aplicación quincenal.

Una vez finalizados los trámites legales de registro mencionados y elaborados los documentos técnicos requeridos, se procedió con la solicitud de registro de venta ante el ICA. Dicha solicitud fue radicada en febrero de 2016 y su registro fue concedido mediante Resolución 0004565 del 26 de abril de 2016 para el control de mosca blanca (*Bemisia tabaci*) en el cultivo de algodón.

En los últimos dos años, la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) ha validado el uso del producto Lecabiol® para los cultivos de soya y tomate. Con este fin, en febrero de 2016 se solicitó ante el ICA la aprobación del protocolo para el desarrollo de la prueba de eficacia en soya, y se recibió aprobación en abril del mismo año. Para el cultivo de tomate, la solicitud se radicó en diciembre de 2016, y en enero de 2017 se recibió su aprobación.

Actualmente, se cuenta con la Resolución 00017959 del 21 de diciembre de 2017 con la que se obtuvo el registro para los cultivos de tomate, pimentón, berenjena, uchuva, tomate de árbol y ají.

Para lograr la vinculación de Lecabiol® con el mercado, AGROSAVIA patentó la tecnología de formulación y estableció dos estrategias comerciales. La primera contempló la negociación de su producción con una de las empresas líderes en producción de hongos biocontroladores, ya que, de acuerdo con las proyecciones de ventas, para satisfacer la demanda del mercado se requiere de un mayor volumen de producción, que no puede satisfacerse con la producción en la planta de AGROSAVIA. Como segunda estrategia comercial, la Corporación está negociando la distribución de este bioinsumo con una empresa reconocida en el sector, ya que, por su accionar como entidad de investigación, no cuenta con un equipo de ventas dedicado a la publicidad y comercialización que garantice la disponibilidad del producto en las zonas de influencia.

Retos en el registro de bioplaguicidas a base de agentes de control biológico

La adopción e implementación de bioplaguicidas aumenta de manera importante a nivel mundial (Arora, Mehnaz, & Balestrini, 2016). Con una participación actual de solamente un 5 % en el mercado de protección de cultivos, su crecimiento anual está proyectado entre un 14 % y un 17 %, y se estima que alcance los US$78,7 billones para el año 2021, lo cual lo convierte en el segmento de mercado con más rápido crecimiento en el área de la agricultura (Research and Markets, 2017).

Debido a esta alta demanda de innovación, el área de investigación y desarrollo de estos bioproductos está enfocada en la búsqueda de nuevos microorganismos, la utilización de herramientas moleculares y el desarrollo de nuevos sistemas de producción, formulación y entrega que, en conjunto, brinden alternativas para la comercialización de bioplaguicidas (Arora et al., 2016). Sin embargo, para que estos nuevos productos sean comercializados, es necesario flexibilizar y adaptar el proceso de registro y de regulación a nivel mundial. Por esta razón, es fundamental que exista un diálogo entre la industria, los científicos y los entes gubernamentales, para que se logre el desarrollo de un sistema de regulación común, que se adapte a la innovación y al desarrollo tecnológico en el área de bioplaguicidas. Se describen a continuación los principales retos en el proceso de registro de bioplaguicidas a nivel mundial.

Unificación de requisitos y del proceso de registro

La unificación de los requisitos para el registro de los bioplaguicidas alrededor del mundo sigue siendo un gran problema. La mayoría de las jurisdicciones no ha desarrollado guías específicas para la evaluación de bioplaguicidas microbiales, lo que resulta en un inapropiado y largo proceso de registro, derivado de los requisitos exigidos para el registro de plaguicidas de síntesis química. Algunos países han desarrollado guías especiales, como la Agencia de Protección Ambiental (EPA) en Estados Unidos (Leahy et al., 2014), pero esto no es suficiente. Otro factor que también complica el proceso de registro es la importación de bioplaguicidas a nuevas regiones, debido a que, si la cepa no es nativa del país, se puede considerar como introducción de un organismo exótico en el país, con lo cual es necesario aclarar los requisitos para su ingreso y registro por parte de las entidades competentes.

La visión de que los bioplaguicidas tienen características que requieren unas consideraciones particulares para su registro es compartida por la EPA (EE. UU.), la UE, la OECD (Biopesticide Steering Committee) y muchos países más (Canadá, Japón, Australia y Nueva Zelanda, por ejemplo). Todos estos, por tanto, están envueltos en la tarea de desarrollar un proceso de registro unificado (Kabaluk, Svircev, Goettel, & Woo, 2010).

En otros países como Brasil, China, Ghana, India, Kenia, Colombia y el sureste de Asia, también se considera que los bioplaguicidas tienen características especiales y, en efecto, cuentan con un proceso específico para su registro (Arora et al., 2016; Czaja et al., 2015; Lim et al., 2014; Matthews, 2014). Sin embargo, todavía hay muchos países en los que los bioplaguicidas son evaluados y registrados con el mismo sistema aplicado a los plaguicidas químicos, lo que conlleva una carga reglamentaria innecesaria y costosa orientada a satisfacer los requisitos de pruebas inadecuadas.

En algunos países, por ejemplo, se exigen pruebas de estabilidad acelerada con métodos referenciados para productos químicos, en los cuales los insumos son almacenados a 54 °C, lo cual no tiene ningún sentido para el caso de productos cuyos principios activos son microorganismos vivos. Otro de los riesgos para el ente regulador al utilizar el registro de plaguicidas químicos para el fin que no le corresponde es solicitar información inapropiada. No obstante, algunas autoridades reguladoras, como la del Reino Unido, han reconocido que basar el registro de bioplaguicidas en reglamentaciones de plaguicidas químicos ha sido una barrera para su comercialización (Hamer, 2014).

Costo de registro

En el caso de Estados Unidos, el registro se desarrolla en dos fases: el registro separado del principio activo y el del producto terminado. Esto puede tomar entre cuatro y cinco años, y el costo puede estar alrededor de los US$623.000, aunque este valor sigue siendo menor que el costo del registro de un insecticida químico (Glare & Moran-Diez, 2016). En Colombia, es necesario contar con el registro como productor y el registro del producto, por lo que el tiempo promedio de obtención está entre dos y cuatro años, con un costo aproximado de US$4.000. Sin embargo, estos altos costos no los pueden asumir pequeñas empresas, y menos aún cuando se están iniciando en

el negocio del biocontrol. Por esta razón, en algunos lugares, esta es una de las mayores dificultades en el proceso de registro.

Entidades de regulación sin la experiencia en el desarrollo de bioplaguicidas

En algunas entidades de regulación alrededor del mundo, estos procesos los realizan personas que no tienen la experiencia o que están por periodos cortos en estas posiciones y no alcanzan a ser entrenadas en el tema. Cuando el ente regulador no cuenta con la experiencia, suele solicitar información innecesaria al fabricante o exigir nuevos estudios que generan grandes gastos y aumento en el tiempo de obtención de registro (Chandler et al., 2011). Específicamente en Colombia, como se observó arriba en este capítulo, se ha hecho un esfuerzo por parte del ente gubernamental para contar con una dependencia específica para el control, regulación y registro de bioplaguicidas. Sin embargo, es necesario que esta oficina sea consciente del cambio del mercado en los bioproductos y, por lo tanto, que las leyes y resoluciones sean revisadas cada cierto tiempo de acuerdo con la necesidad de los productores.

El desarrollo de productos innovadores requiere de una nueva reglamentación

Para garantizar que los nuevos bioplaguicidas que resulten de los últimos avances científicos —específicamente, aquellos que hacen uso de herramientas moleculares y que conllevan alguna modificación genética— puedan llegar al mercado, es necesario que aquellos países que no contemplan su uso en sus regulaciones se actualicen, de lo contrario, se requerirá mucho más tiempo y dinero para su adopción y comercialización.

Perspectivas en investigación y su relación con las regulaciones

Entre otros factores, el crecimiento del mercado de los bioplaguicidas se verá impulsado por los siguientes:

- El uso de agentes de biocontrol en programas de manejo integrado de plagas (MIP) en combinación con productos químicos.
- Los cultivos de gran extensión que resultan altamente costosos si se tratan solo con insumos químicos.
- El desarrollo de productos innovadores (nuevas formulaciones más estables y con varios usos).
- El desarrollo o descubrimiento de nuevos principios activos, como los desarrollos logrados mediante el uso de herramientas moleculares.
- Las presiones regulatorias y cambios en las políticas que se enfocan en la seguridad del medioambiente.

Por otra parte, en las últimas reuniones internacionales de productores de bioplaguicidas de la Annual Biocontrol Industry Meeting (ABIM) realizadas entre 2015 y 2016, se ha declarado que la nueva estrategia de negocios de esta industria está ligada a la búsqueda de nuevos mercados (cultivos de grandes extensiones), a dominar el proceso de producción y al uso de productos innovadores. Estos últimos incluyen la identificación de productos naturales químicos, la utilización de herramientas moleculares y las mejoras en los procesos de fermentación dirigidas a aumentar el rendimiento del principio activo. La nueva generación de estos desarrollos se basará, por tanto, en la combinación de moléculas, la explotación de metabolitos secundarios y otros coadyuvantes y en la capacidad de mantener estos bioproductos estables sin refrigeración y por largos periodos de tiempo.

Si se tiene en cuenta que el objetivo de una investigación en temas de control biológico es poner en manos de

los agricultores los bioplaguicidas y posicionarlos, es necesario que exista una mayor comunicación entre los grupos de investigación, la industria y los agricultores en las diferentes etapas del desarrollo, y que las regulaciones de registro existentes se ajusten a estos nuevos avances tecnológicos que, al final, desencadenarán nuevas generaciones de bioplaguicidas.

Se muestran, a continuación, algunas líneas de investigación sobre nuevos descubrimientos técnicos que pueden conducir al desarrollo comercial de bioplaguicidas exitosos y que deben ser consideradas en la regulación.

Avances en los sistemas de producción

La producción eficiente del ACB es un paso crucial para garantizar la disponibilidad del producto, pero puede influir en gran medida en el costo del desarrollo y en su comercialización. Un buen ejemplo de esto es la producción de baculovirus, que ha sido investigada durante mucho tiempo. Actualmente, la tecnología de cultivo celular aún no es comercialmente viable en muchos casos para estos virus, y la producción *in vivo* sigue siendo el único método de producción industrial. Un avance en esta área aumentaría enormemente el potencial del virus y, por lo tanto, su masificación en el mercado, más aún, si se tiene en cuenta que el baculovirus es un principio activo más estable que muchos hongos y bacterias y que puede ser almacenado sin necesidad de refrigeración. La modificación genética de los baculovirus podría mejorar la velocidad de acción y disminuir la dosis requerida. Sin embargo, este desarrollo debe ir de la mano con la producción *in vitro*, para que la producción siga siendo económicamente factible (Inceoglu et al., 2001; Szewczyk, Hoyos-Carvajal, Paluszek, Skrzecz, & Lobo de Souza, 2006).

Avances en la formulación

Un buen sistema de producción combinado con una buena formulación es clave para el éxito comercial de los bioplaguicidas. Esta última debe estabilizar los principios activos durante su producción, aplicación, distribución y almacenamiento; debe ayudar en el manejo y aplicación del producto; debe proteger el agente de los factores ambientales dañinos y potenciar su actividad. Una de estas nuevas estrategias de formulación es el uso de materiales nanométricos, que mejoren la penetración, especificidad y liberación de los principios activos, y que consigan disminuir las dosis de aplicación (Kah, 2015; Sundari, Singh, & Yadava, 2016).

Con respecto al tipo de formulaciones, se ha investigado en el desarrollo de nanoemulsiones, nanogeles, nanoesferas y nanofibras, con la utilización de polímeros diseñados para la industria farmacéutica, cosmética o alimenticia (con características de liberación diferenciadas y con potencial para ser controladas por las condiciones fisicoquímicas del medio) (Kah, 2015). Por ejemplo, las nanopartículas de *Bacillus thuringiensis* han demostrado tener una buena dispersión, humectabilidad y degradación en el suelo y en el medioambiente (Mahadeva Swamy & Asokan, 2013).

Las microemulsiones son un tipo de formulación de segunda generación con mayor potencial como sistema de liberación de bioplaguicidas. Son sistemas cinéticamente estables, compuestos básicamente de una fase acuosa, una fase oleosa y tensioactivos con tamaño de gota en el orden de 100 nm. Se caracterizan por mejorar la penetración y, al mismo tiempo, la solubilidad y dispersión de los principios activos, de forma que aumentan la eficacia de los bioproductos, puesto que permiten disminuir su dosis de aplicación (Saranya, Chandrasekaran, & Mukherjee, 2012). Este tipo de formulaciones se ha utilizado para aceites esenciales, metabolitos, compuestos químicos de insecticidas y algunos bioplaguicidas (Saranya et al., 2012).

También se ha venido trabajando en formulaciones novedosas en las cuales los microorganismos son protegidos utilizando técnicas de encapsulación (Sundari et al., 2016). Este procedimiento ha mostrado ser uno de los más eficientes para la protección de microorganismos, dado que evita el daño celular y la pérdida de viabilidad frente a los rayos ultravioleta del sol, y además facilita la liberación

controlada del microorganismo (Camacho Kurmen, Gómez Álvarez, & Villamizar Rivero, 2015).

El reto en el área de regulación y registro de bioplaguicidas es acompañar el desarrollo de técnicas de control de calidad y de evaluación de riesgo que permitan demostrar fehacientemente las propiedades y beneficios de estas innovadoras formulaciones.

Mejoramiento genético de los agentes de control biológico

Tal vez el mayor avance en el desarrollo de bioplaguicidas se obtenga a partir del conocimiento y aprovechamiento del genoma de las plagas y de sus enemigos naturales. Muchos investigadores están utilizando tecnologías de base molecular para reconstruir la evolución de los enemigos naturales microbianos y separar la base molecular de su patogenicidad. Esta información permitirá una nueva visión de la interacción plaga-bioplaguicida y dará lugar a nuevas posibilidades de mejoramiento de cepas: se aumentará su eficacia, su espectro de acción, su estabilidad, etc. (Sundari et al., 2016).

En los últimos años se ha presentado un avance muy grande en el mejoramiento de cepas en cuanto a la virulencia, uso de menores dosis y aumento de la eficacia (Lu, Pava-Ripoll, Li, & Wang, 2008; Pava-Ripoll, Posada, Momen, Wang, & St. Leger, 2008). Dichas cepas son ofrecidas a empresas de bioplaguicidas con la finalidad de disponer de productos más eficaces y más económicos. Un ejemplo del mejoramiento frente a la ampliación en espectro de acción y uso comercial usando estas estrategias es el producto BtBooster (Abdullah Moussa, Taylor, & Adang, 2009), comercializado en EE. UU. Esta estrategia implica la combinación de péptidos de insectos y la toxina de Bt, que mejoran su actividad biológica ampliamente.

Por otra parte, continúa en aumento la secuenciación de genomas de diversas plagas, por lo tanto, el uso de técnicas como la del ARN interferente para el manejo de plagas podría ser puesta en práctica comercialmente en un futuro cercano (Olson, 2015). Por el momento, estas estrategias son utilizadas en Estados Unidos, pero no son una opción en la Unión Europea, ya que no son permitidas allí por regulación. De hecho, este tipo de productos no son contemplados en la mayoría de las regulaciones existentes y no hay claridad sobre los requisitos para su registro (Seiber, Coats, Duke, & Gross, 2014).

Así, pues, los nuevos bioplaguicidas que resulten de estos avances científicos pueden estimular la adopción de nuevas políticas en diferentes países para lograr su uso. Ya se ha visto esto con los cultivos modificados genéticamente (organismos genéticamente modificados [OGM]). En los Estados Unidos, Canadá, China, India y Brasil, los agricultores han adoptado rápidamente los cultivos transgénicos (en amplias áreas) que expresan los genes Bt d-endotoxina. En EE. UU., por ejemplo, se usan GM en el 63 % de la superficie plantada de maíz y en el 73 % de la superficie de algodón, por lo tanto, la EPA incluye los transgénicos como una categoría de los bioplaguicidas (Chandler et al., 2011).

La aceptación y regulación de un organismo genéticamente modificado, en todo caso, es todavía un enorme obstáculo (Vlak, 2009). El uso más generalizado de los productos existentes podría proporcionar a las empresas un mercado más amplio y un mejor retorno de la inversión, sin embargo, en Europa existe una resistencia generalizada entre los consumidores a los cultivos transgénicos. Este tema se excluye del proceso de regulación de bioplaguicidas, con lo cual la normativa de estas nuevas tendencias requerirá mucho más tiempo para su adopción.

Uso de microorganismos endófitos

Una de las áreas de investigación que está creciendo rápidamente es la explotación de microorganismos endófitos, dado que los hongos y bacterias que se encuentran comúnmente dentro de las plantas pueden conferirles resistencia a insectos plaga y enfermedades (Porras-Alfaro & Bayman, 2011).

Por otra parte, el modelo de desarrollo de los bioplaguicidas tiene que ser modificado para investigar

con una perspectiva más biológica-ecológica, con el fin de comprender las verdaderas complejidades de las interacciones ecológicas que se producen entre los enemigos naturales microbianos, las plagas, las plantas y los otros componentes de los agroecosistemas. Por ejemplo, especies como *B. bassiana* y *M. anisopliae*, que tradicionalmente se usan como patógenos de insectos, ahora también pueden funcionar como endófitos de las plantas, como antagonistas de fitopatógenos, como colonizadores de rizosfera y como promotores de crecimiento de las plantas.

Esto crea oportunidades nuevas y emocionantes para su explotación en programas de MIP. Hay muy buenos ejemplos de estas nuevas líneas de investigación: el uso de hongos entomopatógenos para controlar enfermedades de las plantas y nematodos (Goettel et al., 2008), el uso de hongos entomopatógenos como endófitos contra insectos (Vega, 2008) y enfermedades de plantas (Ownley et al., 2008) y el uso de agentes de control de enfermedades microbianas que también demuestran actividad insecticida (Keel & Maurhofer, 2009). Tales productos con un mayor espectro de acción satisfarán a los clientes y serán más competitivos frente a los productos químicos (Glare & Moran-Diez, 2016).

Además, los microorganismos endófitos pueden producir un rango de metabolitos secundarios bioactivos como alcaloides, cuya producción depende de la cepa del hongo presente y de la planta huésped, lo cual podría mejorar la actividad biológica o disminuir la dosis del futuro bioplaguicida. La literatura sobre endófitos está creciendo exponencialmente en la actualidad, y es probable que surjan nuevos productos o variedades vegetales con este tipo de microorganismos. Sin embargo, las regulaciones tienen que ser claras sobre los requisitos para su registro, ya que estas aún no son del todo comprensibles en cuanto a aspectos toxicológicos.

Uso de sustancias bioactivas

En cuanto al principio activo, se ha buscado trabajar no solo con los microorganismos, sino también con sus metabolitos, los cuales pueden ser más fáciles de estabilizar en una formulación y, por lo tanto, tener un mayor tiempo de vida útil.

En la actualidad, existen varios ejemplos de las bondades del uso de este tipo de sustancias en las formulaciones de bioplaguicidas que favorecen la actividad biológica. Por ejemplo, Serenade® es un producto a base de *Bacillus subtilis*, que contiene microorganismos vivos y una combinación conocida de lipopéptidos (agrastatinas). En estos casos, no siempre será necesario que el microorganismo esté vivo para que un producto sea efectivo, ya que el efecto bioactivo está presente debido a los compuestos secundarios. Los compuestos secundarios microbianos pueden producirse y optimizarse en los procesos de fermentación y también pueden tener más equivalencia de plaguicidas sintéticos, lo cual facilita su incorporación en la práctica actual de manejo de plagas (Glare & Moran-Diez, 2016). Sin embargo, por esta misma causa, en algunas regulaciones no son considerados como productos biológicos, razón por la cual no se pueden usar como medios de control biológico.

Otros aspectos del control biológico

En los últimos 25 años, el enfoque de la investigación en biocontrol ha evolucionado de forma holística, ecológica y más orientada hacia los sistemas de producción y las preocupaciones de la industria. Es probable que esta evolución continúe, ya que la investigación en producción, formulación y entrega podría ayudar en gran medida a la comercialización de agentes de control biológico. Sin embargo, se necesita más investigación sobre la integración de estos agentes en los sistemas de producción agrícola, como su rotación con plaguicidas de síntesis química y el uso de modelos de pronóstico para decidir en qué momento se debe aplicar un producto químico o un agente de biocontrol. Todo lo anterior debe estar apoyado con las disposiciones de los entes de regulación y registro, con el fin de brindar un producto seguro, eficiente y de alta calidad al agricultor.

Conclusiones

Como se ha evidenciado en el presente capítulo, uno de los mayores desafíos para la adopción de tácticas de control biológico mediante el uso de bioplaguicidas es la falta de marcos regulatorios acordes con el tipo de producto biológico. Por lo tanto, es vital que los entes reguladores a nivel mundial armonicen los procedimientos de registro, pero, al mismo tiempo, que estos sean lo suficientemente estrictos para garantizar la calidad de los bioproductos que se encuentren en el mercado y le lleguen directamente al agricultor.

Este tipo de armonización solamente se logrará si existe una buena comunicación entre la comunidad científica, la industria y el gobierno, que permita entender que el área de bioplaguicidas es un área de investigación y de innovación en constante movimiento. Por lo tanto, la revisión y actualización de la regulación debe ser acorde con las necesidades del productor y del agricultor. Lo anterior beneficiará el mercado y la adopción de bioplaguicidas y garantizará su calidad, lo que se verá reflejado en una mayor participación en el mercado de protección de cultivos y en la adopción de manera cotidiana de este tipo de alternativas.

Referencias

Abdullah, M. A., Moussa, S., Taylor, M. D., & Adang, M. J. (2009). *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) cadherin fragments function as synergists for Cry1A and Cry1C *Bacillus thuringiensis* toxins against noctuid moths *Helicoverpa zea, Agrotis ipsilon and Spodoptera exigua*. *Pest Management Science*, *65*(10), 1097-1103. doi: 10.1002/ps.1798.

African Agricultural Technology Foundation (AATF). (2013). *A guide to the development of regulatory frameworks for microbial biopesticides in Sub-Saharan Africa*. Nairobi, Kenia: African Agricultural Technology Foundation.

Agriculture and Agri-Food Canada. (2013). *Directory of biopesticides for agricultural crops in OECD countries*. Recuperado de https://www5.agr.gc.ca/MPDD-CPM/search-recherche.do?lang=eng

Arora, N. K., Mehnaz, S., & Balestrini, R. (Eds.). (2016). *Bioformulations: for sustainable agriculture*. Nueva Delhi, India: Springer.

Balog, A., Hartel, T., Loxdale, H. D., & Wilson, K. (2017). Differences in the progress of the biopesticide revolution between the EU and other major crop-growing regions. *Pest Management Science*, *73*(11), 2203-2208. doi: 10.1002/ps.4596.

Bateman, A., & Bycroft, M. (2000). The structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD). *Journal of Molecular Biology*, *299*(4), 1113-1119. doi.10.1006/jmbi.2000.3778.

Braverman, M. P., Kunkel, D. L., & Baron, J. J. (2014). Biopesticide registration successes of the IR-4 project and changes in regulatory requirements. En A. D. Gross, J. R. Coats, S. O. Duke, & J. N. Seiber (Eds.), *Biopesticides: State of the art and future opportunities* (pp. 259-265). Princeton, EE. UU.: American Chemical Society.

Camacho Kurmen, J. E., Gómez Álvarez, M. I., & Villamizar Rivero, L. F. (2015). Microencapsulation of a Colombian *Spodoptera frugiperda* Nucleopolyhedrovirus with Eudragit® S100 by spray drying. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *58*(3), 468-476.

Central Insecticides Board and Registration Committee (CIBRC). (s. f.). *Registration procedure*. Recuperado de http://www.cibrc.nic.in/reg_procedure.htm.

Chandler, D., Bailey, A. S., Tatchell, G. M., Davidson, G., Greaves, J., & Grant, W. P. (2011). The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *366*(1573), 1987-1998. doi: 10.1098/rstb.2010.0390.

Cotes, A. M. (2011). Registry and regulation of biocontrol agents on food commodities in South America. *Acta Horticulturae*, *905*, 301-306. doi: 10.17660/ActaHortic.2011.905.33.

Czaja, K., Góralczyk, K., Struciński, P., Hernik, A., Korcz, W., Minorczyk, M., ... Ludwicki, J. K. (2015). Biopesticides –towards increased consumer safety in the European Union. *Pest Management Science*, *71*(1), 3-6. doi: 10.1002/ps.3829.

Desai, S., Kumar, G. P., Amalraj, E. L. D., Talluri, V. R., & Peter, A. J. (2016). Challenges in regulation and registration of biopesticides: An overview. En D. Singh, H. Singh, & R. Prabha (Eds.), *Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity* (vol. 2, pp. 301-308). Nueva Delhi, India: Springer.

European Union. (2009). *Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 establishing a framework for community action to achieve the sustainable use of pesticides*. Recuperado de http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=celex%3A32009L0128

Food and Agriculture Organization (FAO). (2013). *Advancement of pesticide regulatory management in Asia*. Recuperado de http://www.fao.org/3/a-i3323e.html.

García-González, J. (1996). *Evaluación de seis cepas nativas de Verticillium lecanii (Zimm), Viegas (Deuteromycetes: Moniliales) en el control de la mosca blanca de los invernaderos*

Trialeurodes vaporariorum (Westwood) (Trabajo de grado). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Glare, T. R., & Moran-Diez, M. E. (Eds.). (2016). *Microbial-based biopesticides: Methods and protocols*. Nueva York, EE. UU.: Humana Press.

Goettel, M. S., Koike, M., Kim, J. J., Aiuchi, D., Shinya, R., & Brodeur, J. (2008). Potential of *Lecanicillium* spp. for management of insects, nematodes and plant diseases. *Journal of Invertebrate Pathology*, *98*(3), 256-261. doi.10.1016/j.jip.2008.01.009.

Grzywacz, D. (2003). Development and registration of biopesticides in Asia. En *Registration in rest of world*. Recuperado de https://goo.gl/ZtYXwc.

Hamer, A. (2014). Registration of biopesticides in Europe and OECD countries. En *Registration in the rest of world* (pp. 111-116). Recuperado de https://goo.gl/ZtYXwc.

Huber, L. (s. f.). *Biopesticides and the EU regulatory process*. Recuperado de http://www.scc-gmbh.de/images/documents/Agrow-Biopesticides-2016-SCC-Scientific.pdf.

Inceoglu, A. B., Kamita, S. G., Hinton, A. C., Huang, Q., Severson, T. F., Kang, K. D., & Hammock, B. D. (2001). Recombinant baculoviruses for insect control. *Pest Management Science*, *57*(10), 981-987. doi: 10.1002/ps.393.

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (19 de octubre de 1995). Por la cual se dictan disposiciones sobre la industria, comercio y aplicación de bioinsumos y productos afines, de abonos o fertilizantes, enmiendas, acondicionadores del suelo y productos afines; plaguicidas químicos, reguladores fisiológicos, coadyuvantes de uso agrícola y productos afines. [Resolución 3079 de 1995]. Recuperado de https://goo.gl/CNa6eP.

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) (27 de febrero de 2004). Por la cual se dictan disposiciones sobre el registro y control de los bioinsumos y extractos vegetales de uso agrícola en Colombia. [Resolución 375 de 2004]. Recuperado de https://goo.gl/UAoWxA.

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (4 de febrero de 2011). Por medio de la cual se establecen los requisitos para el registro de departamentos técnicos de ensayos de eficacia, productores e importadores de bioinsumos de uso agrícola y se dictan otras disposiciones. [Resolución 698 de 2011]. Recuperado de https://goo.gl/8urvd5.

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (s. f.). *Empresa bioinsumos diciembre de 2017*. Recuperado de https://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Fertilizantes-y-Bio-insumos-Agricolas/Listado-de-Bioinsumos/2009/EMPRESAS-REGISTRADAS-BIOINSUMOS-JULIO-8-DE-2008.aspx.

Instituto Nacional de Salud (INS). (19 de mayo de 2014). Por la cual se expide concepto toxicológico de plaguicidas para uso agrícola al producto Lecabiol [Resolución 0415 de 2014].

Instituto Nacional de Salud (INS). (18 de diciembre de 2015). Por la cual se expide concepto toxicológico GFRA-CT-2015-0189 del insecticida biológico de uso agrícola de nombre comercial Lecabiol. [Resolución 1505 de 2015].

Kabaluk, J. T., Svircev, A. M., Goettel, M. S., & Woo, S. G. (Ed.). (2010). *The use and regulation of microbial pesticides in representative jurisdictions worldwide*. Recuperado de https://goo.gl/v9wCAV.

Kah, M. (2015). Nanopesticides and nanofertilizers: Emerging contaminants or opportunities for risk mitigation? *Frontiers in Chemistry*, *3*(64). doi.10.3389/fchem.2015.00064.

Keel, C., & Maurhofer, M. (2009). Insecticidal activity in root-associated, plant-beneficial pseudomonads. *IOBC/WPRS Bulletin*, *45*, 181.

Keswani, C., Sarma, B. K., & Singh, H. B. (2016). Synthesis of policy support, quality control, and regulatory management of biopesticides in sustainable agriculture. En H. B. Singh, B. K. Sarma, & C. Keswani (Eds.), *Agriculturally important microorganisms: commercialization and regulatory requirements in Asia* (pp. 3-12). Singapur: Springer.

Leahy, J., Mendelsohn, M., Kough, J., Jones, R., & Berckes, N. (2014). *Biopesticide oversight and registration at the US Environmental Protection Agency*. Recuperado de https://goo.gl/vyHUqe.

Leng, P., Zhang, Z., Pan, G., & Zhao, M. (2011). Applications and development trends in biopesticides. *African Journal of Biotechnology*, *10*(86), 19864-19873.

Lim, L., Hj Awg, S. A., Kean, S., Iswari, D., Sikaisone, P., Binti, A. ... Jäkel, T. (2014). *ASEAN Guidelines on the regulation, use, and trade of Biological Control Agents (BCA) - Implementing biological control agents in the ASEAN region: Guidelines for policy makers and practitioners*. Recuperado de https://goo.gl/DpwdvJ. doi: 10.13140/2.1.1436.0643.

Lu, D., Pava-Ripoll, M., Li, Z., & Wang, C. (2008). Insecticidal evaluation of *Beauveria bassiana* engineered to express a scorpion neurotoxin and a cuticle degrading protease. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *81*(3), 515-522. doi: 10.1007/s00253-008-1695-8.

Mahadeva Swamy, H. M., & Asokan, R. (2013). *Bacillus thuringiensis* as 'Nanoparticles'-a perspective for crop protection. *Nanoscience and Nanotechnology-Asia*, *3*(1), 102-105.

Matthews, K. A. (2014). Regulation of biopesticides by the Environmental Protection Agency. En A. D. Gross, J. R.

Coats, S. O. Duke, & J. N. Seiber (Eds.), *Biopesticides: State of the art and future opportunities* (pp. 267-279). Princeton, EE. UU.: ACS Publications.

Olson, S. (2015). An analysis of the biopesticide market now and where it is going. *Outlooks on Pest Management, 26*(5), 203-206. doi: 10.1564/v26_oct_04.

Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD). (2003). *Guidance for registration requirements for microbial pesticides*. Recuperado de http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2003)5&doclanguage=en.

Ownley, B. H., Griffin, M. R., Klingeman, W. E., Gwinn, K. D., Moulton, J. K., & Pereira, R. M. (2008). *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. *Journal of Invertebrate Pathology 98*(3), 267-270. doi: 10.1016/j.jip.2008.01.010.

Pava-Ripoll, M., Posada, F. J., Momen, B., Wang, C., & St. Leger, R. (2008). Increased pathogenicity against coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) by *Metarhizium anisopliae* expressing the scorpion toxin (AAIT) gene. *Journal of Invertebrate Pathology*, *99*(2), 220-226. doi: 10.1016/j.jip.2008.05.004.

Pest Management Regulatory Agency (PMRA). (2001). *Guidelines for the registration of microbial pest control agents and products*. Recuperado de https://goo.gl/MKM8t3.

Porras-Alfaro, A., & Bayman, P. (2011). Hidden fungi, emergent properties: Endophytes and microbiomes. *Annual Review of Phytopathology*, *49*, 291-315. doi: 10.1146/annurev-phyto-080508-081831.

Pucheta Díaz, M., Flores Macías, A., Rodríguez Navarro, S., & De la Torre, M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, *31*(12), 856-860.

Ravensberg, W. J. (2011). *Progress in biological control: A roadmap to the successful development and comercialization of microbial pest contro products for control of arthropods*. Londres, Reino Unido: Springer.

Research and Markets. (2017). *Global markets for biopesticides*. Recuperado de https://www.researchandmarkets.com/research/s5c9q8/global_markets.

Sansinenea, E. (2016). Regulatory issues in commercialization of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides. En H. B. Singh, B. K. Sarma, & C. Keswani (Eds.), *Agriculturally important microorganisms. Commercialization and regulatory requirements in Asia* (pp.69-80). Singapur: Springer.

Saranya, S., Chandrasekaran, N., & Mukherjee, A. (2012). Antibacterial activity of eucalyptus oil nanoemulsion against *Proteus mirabilis*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *4*(Supp. 3), 668-671.

Seiber, J. N., Coats, J., Duke, S. O., & Gross, A. D. (2014). Biopesticides: state of the art and future opportunities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(48), 11613-11619. doi.10: 1021/jf504252n.

Sundari, S., Singh, A., & Yadava, P. (2016). Review of current research advances in microbial and phyto-biopesticides. *International Journal of Biomedical Science and Engineering*, *2*(1), 73-77. doi: 10.15446/acag. v66n2.54354.

Szewczyk, B., Hoyos-Carvajal, L., Paluszek, M., Skrzecz, I., & Lobo de Souza, M. (2006). Baculoviruses —re-emerging biopesticides. *Biotechnology Advances*, *24*(2), 143-160. doi: 10.1016/j.biotechadv.2005.09.001.

Vega, F. E. (2008). Insect pathology and fungal endophytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, *98*(3), 277-279. doi: 10.1016/j.jip.2008.01.008.

Vlak, J., (2009). Genetic engineering of baculoviruses for biocontrol: dead end or bright future. *IOBC/wprs Bulletin*, *45*, 517-518.

Weidenauer, M. (2015). *Registration of Bio-pesticides in Europe under regulation (EC) No. 1107/2009 and its difference to the US procedure* [Archivo de video]. Recuperado de https://goo.gl/6j6fnm.

Zambrano Moreno, D. C., Bonilla Buitrago, R. R., Avellaneda, L., & Zambrano, G. (2015). Análisis prospectivo de los bioinsumos agrícolas en Colombia: una consulta a expertos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *17*(2), 103-113. doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.48472.

Capítulo 14

Investigación, desarrollo y registro de enemigos naturales para control biológico. Caso: *Phytoseiulus persimilis*

Chapter 14

Research, development and registry of natural enemies for biological control. Case: *Phytoseiulus persimilis*

Sandra Milena Aragón Rodríguez,[1] Yohana Alexandra Martínez Vargas,[2] Alexander Escobar Sabogal,[2] Martha L. Rodríguez[3]

[1] Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA)

[2] Bichopolis S. A. S.

[3] Agilitech S. A. S.

Contenido

Introducción 720

Contexto histórico 720

Aspectos considerados para iniciar una producción masiva de ácaros depredadores 721

Producción masiva de ácaros depredadores a escala comercial 723

Estrategias de cosecha, almacenamiento y distribución de enemigos naturales 727

Cosecha 727

Criterios para la liberación en campo 727

Limitantes del sistema de producción 730

Establecimiento 731

Implementación de ácaros depredadores en la producción de flores: caso Ságaro Flowers S. A. 731

Regulación internacional para la implementación del control biológico de plagas mediante la liberación de enemigos naturales 734

Global G.A.P. 734

Convenio sobre la diversidad biológica 734

Acuerdo de acceso y beneficio compartido 734

Proceso de registro y comercialización de enemigos naturales en Colombia ... 735

Nicho de mercado de enemigos naturales en Colombia 736

Limitantes de la adopción de la tecnología 736

Conclusiones y perspectivas 739

Agradecimientos 739

Referencias 740

Resumen

La implementación de estrategias de control biológico de plagas en cultivos comerciales de ornamentales en Colombia es considerada un reto para los comercializadores de insumos agrícolas dedicados a este mercado. Una de las principales limitaciones es la dificultad que tienen dichas compañías para el registro y la comercialización de sus productos biológicos en territorio colombiano, pues actualmente existen algunas restricciones en el uso de los recursos biológicos y en el manejo de la biodiversidad, lo cual ha puesto freno al ingreso de compañías extranjeras al mercado colombiano. A su vez, esta situación ha estimulado la creación de empresas dedicadas a la producción a escala comercial de enemigos naturales para su uso en el sector agrícola en el país. En particular, en este capítulo se discutirá el desarrollo de productos disponibles comercialmente en Colombia para el manejo biológico de poblaciones de ácaros fitófagos en el sector agrícola. Se detallarán las diferentes etapas que se deben seguir con el fin de obtener una cría a escala comercial de ácaros depredadores como *Phytoseiulus persimilis* y *Neoseiulus californicus* para el manejo en invernadero de la araña roja *Tetranychus urticae*, principalmente para su uso en el sector floricultor, y se abordarán los temas de desarrollo de la tecnología con base en la experiencia de la empresa Bichopolis, fundada en el 2010.

Palabras clave

Ácaros depredadores, control biológico, crías masivas, registro comercialización

Abstract

Implementation of biological control of pests' strategies in commercial ornamental crops in Colombia is considered a challenge for the companies dedicated to this market, one of the main limitations for the implementation is the difficulty that these companies have for the registry and commercialize its biological products in Colombian territory. Current restrictions in the use of biological resources and management of biodiversity in Colombia delay the entry of foreign companies into the Colombian market. In turn, this situation has stimulated the creation of firms dedicated to the commercial scale production of natural enemies for use in the agricultural sector in Colombia. In particular, the development of commercially available products in Colombia for the biological management of phytophagous mite populations in the agricultural sector will be discussed in this chapter. The process to obtain a commercial scale rearing of predatory mites such as *Phytoseiulus persimilis* and *Neoseiulus californicus* for the management of the red spider mite *Tetranychus uritcae* in greenhouse conditions mainly in flowers Industry will be detailed. The technology development based on the experience of the company Bichopolis, which was founded in 2010 will be also addressed.

Keywords

Biological control, mass rearing, predatory mites, registry and commercialization

Introducción

En los años noventa, la agricultura en Colombia dirigió la mayoría de sus esfuerzos a optimizar la calidad de los suelos en términos de fertilidad y a su recuperación de los efectos adversos causados por el manejo inadecuado de los agroquímicos que a lo largo de los años han contaminado fuentes de agua, suelos e incluso los productos comercializados. Además, hay estudios que demuestran los efectos adversos de diferentes agroquímicos en el incremento de casos de resistencia por la utilización continua del mismo producto, lo cual genera pérdida de sensibilidad en las poblaciones frente a diferentes principios activos (Peñaranda, 2016).

El control biológico de plagas se ha venido desarrollando en Colombia como una alternativa de manejo que contribuye a la mitigación de los efectos adversos ocasionados por el uso de agroquímicos en los diferentes sistemas productivos. Para el caso particular de los cultivos de flores en Colombia, la Asociación Colombiana de Exportadores de Flores (Asocolflores), la Sociedad de Agricultores de Colombia (SAC) y el entonces Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial (MAVDT) establecieron, en 2006, los lineamientos para la implementación del programa Florverde®, con el fin de incorporar buenas prácticas sociales, ambientales y de calidad en las fincas productoras y exportadoras de flores en Colombia (Asociación Colombiana de Exportadores de Flores [Asocolflores], Sociedad de Agricultores de Colombia [SAC], & Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial [MAVDT], 2006).

Los sellos de calidad promovidos por diferentes entes internacionales para la comercialización de productos libres de residuos químicos y amigables con el medio ambiente, como Global G.A.P., Rainforest Alliance Certified, MPS de Holanda y SwissGAP, así como el creciente desarrollo de estrategias de manejo integrado de plagas y enfermedades en cultivos comerciales, han contribuido a la reducción del uso de agroquímicos en algunos sistemas productivos de Colombia, estimulando así la formación de pequeñas y medianas empresas como Laverlam, Ecoflora, Safer, Orius, LST (Rojas López, Vera, & Arias, 2012) y, recientemente, Bichopolis S. A. S., dedicadas al sector de la producción de agentes de control biológico, como parasitoides y depredadores, y entomopatógenos, como virus, hongos y bacterias, así como algunos nematodos. Es así como se implementaron diferentes desarrollos de investigación científica que dieron lugar a la creación de industrias dedicadas a la producción de enemigos naturales para el control biológico en cultivos de importancia económica en Colombia, los cuales son regulados por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), de la mano con la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA) (Zambrano, Bonilla, Avellaneda, & Zambrano, 2015; Zambrano & Riaño, 2008).

En este capítulo se presentará el caso de la creación de una empresa a partir de los resultados obtenidos de la investigación científica sobre el control biológico de ácaros plaga a través del uso de ácaros depredadores en cultivos comerciales localizados, en su mayoría, en la sabana de Bogotá. Se hará una descripción del proceso de producción de ácaros depredadores a pequeña y gran escala y del proceso de registro de producción y venta de ácaros depredadores para su comercialización en Colombia.

Contexto histórico

El desarrollo de la industria colombiana de control biológico de ácaros plaga mediante depredadores ha estado ligado al sector de producción de flores de corte, que a partir del 2000 incorporó aspectos de sostenibilidad asociados a sellos verdes y otras prácticas de disminución de ingredientes activos aplicados por hectárea de cultivo (Asocolflores et al., 2006).

A nivel mundial, Colombia es uno de los mayores productores de flores de corte, con un área de producción de 2.600 ha. El país tiene su mercado principal en Estados Unidos, Rusia y Canadá, y una participación de mercado del 15 %, después de Holanda (43 %) y por encima de Kenia (11 %), Ecuador (9 %) y Etiopía (9 %)

(Rabobank Group, 2016). El 69 % de la producción de flores del país se concentra en el departamento de Cundinamarca, donde la rosa es la principal especie exportada, con un 29 % de participación que equivale 183 millones de dólares, seguida por el clavel, con un 18,1 % (Departamento Administrativo Nacional de Estadística [DANE], 2010).

Uno de los principales problemas fitosanitarios del cultivo de rosas es el ácaro fitófago *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae), cuyo costo anual de control puede ascender a 4.500 dólares/ha, una cifra que equivale al 30 % del gasto total de plaguicidas (Hilarión, Niño, Cantor, Rodríguez, & Cure, 2008). Este alto costo de control impulsó a los productores a buscar alternativas relacionadas con la producción y la liberación de ácaros depredadores, como *Phytoseiulus persimilis* (Athias-Henriot) (Acari: Phytoseiidae), a gran escala.

P. persimilis es un depredador especialista que consume adultos de la araña roja *Tetranychus urticae*. Este depredador presenta un patrón de distribución agregada en las plantas de rosa, de acuerdo con la distribución espacial de su presa (Chacón-Hernández et al., 2016), y prefiere los tercios medio y superior de la planta, siguiendo la distribución vertical de su alimento (Argüelles et al., 2013; Chacón-Hernández et al., 2016; Hilarión et al., 2008).

A partir de 1998, en el proceso de implementación de *P. persimilis* como alternativa para el manejo de *T. urticae* en los invernaderos de producción de rosas en la sabana de Bogotá, la compañía holandesa Koppert Biological Systems, en alianza con universidades y centros de investigación colombianos, realizó experimentos y estudios de viabilidad de sus productos en territorio colombiano. Sin embargo, este primer acercamiento al mercado colombiano presentó poca efectividad en el manejo de la plaga (Torrado, Pérez, Cure, García, & Echeverri, 2001).

Los primeros resultados no fueron promisorios debido a que los ácaros eran producidos en Holanda e importados a Colombia, lo que implicaba largos tiempos de transporte y nacionalización, con la consecuente muerte de los individuos (Gómez, Pérez, Barreto, Cure, & Torrado, 2004). Los esfuerzos realizados para el establecimiento de los ácaros depredadores en condiciones semicomerciales no fueron entonces exitosos debido a que, al momento de llegar los ácaros a Colombia, ya habían perdido más del 50 % de su viabilidad. Por otra parte, al presentarse problemas de otras plagas (por ejemplo, trips o áfidos), se procedía a la aplicación de productos químicos no compatibles con la tecnología, lo cual no permitía un control biológico exitoso de *T. urticae* (Gómez et al., 2004).

Las primeras importaciones fueron de la especie *Phytoseiulus persimilis*, que se caracteriza por su voracidad y su baja adaptación a las condiciones climáticas locales (figura 14.1a). En las fincas se empezó a encontrar el depredador nativo *Neoseiulus californicus*, adaptado a las condiciones locales (figura 14.1b). El ácaro depredador *P. persimilis* se alimenta de adultos de *T. urticae* (figura 14.1c) (Argüelles et al., 2013), mientras que las especies de *Neoseiulus* son generalistas y consumen todos los estadios de la plaga (figura 14.1d) (McMurtry & Croft, 1997).

En 2015 el costo de un individuo importado era de 60 pesos, por lo que algunas empresas iniciaron sus propias crías con modelos aumentativos para tener los depredadores en la cantidad y la fecha requeridas. Paralelo a los ensayos comerciales realizados por Koppert Biological Systems, el Centro de Investigaciones y Asesorías Agroindustriales de la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano (UJTL) y el grupo de control biológico de la Universidad Militar Nueva Granada (UMNG) comenzaron a realizar investigaciones para desarrollar modelos de cría masiva de ácaros depredadores. La UMNG logró desarrollar un sistema estable e implementar la tecnología de cría en algunas empresas del sector.

Aspectos considerados para iniciar una producción masiva de ácaros depredadores

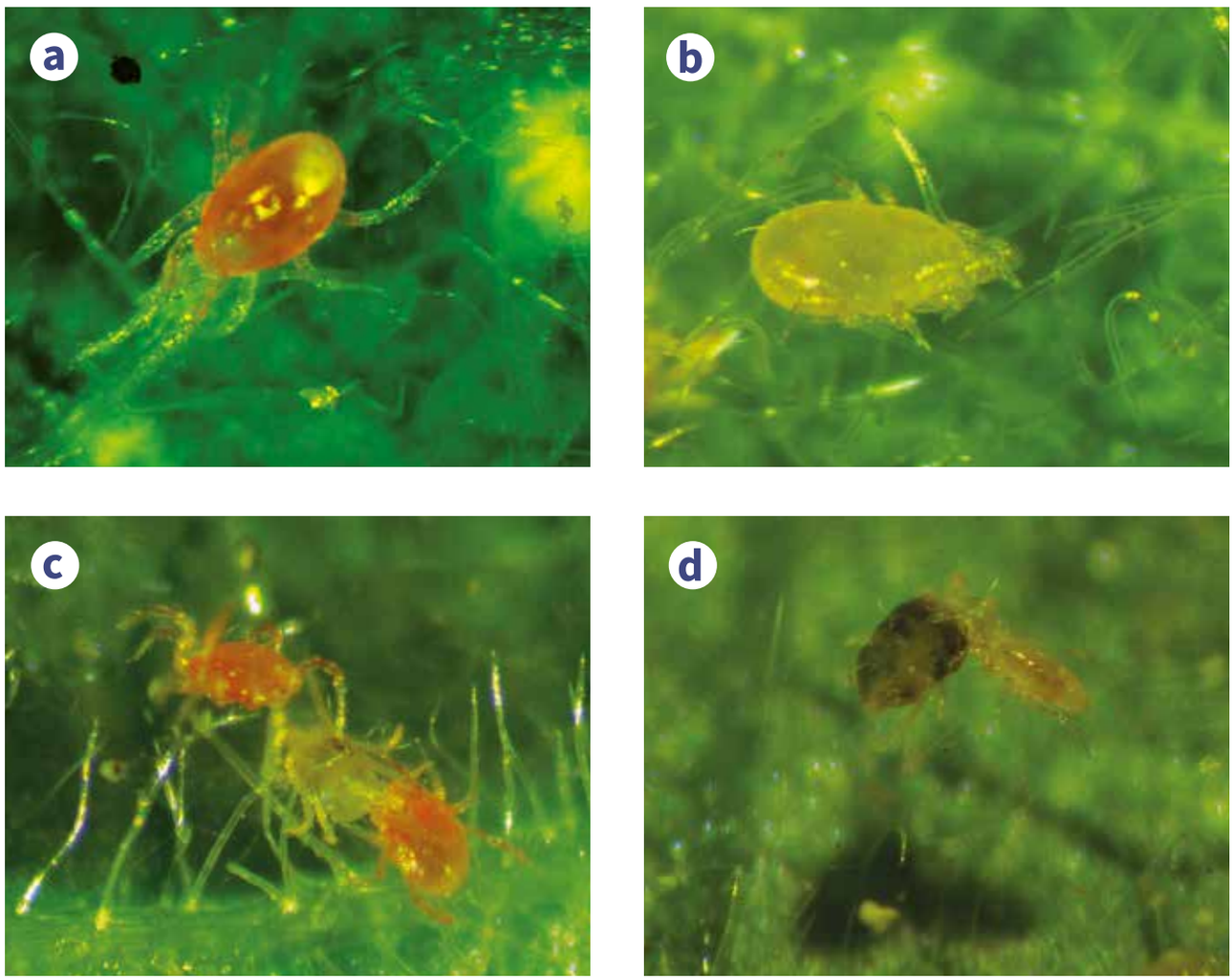
Para comenzar una cría masiva de ácaros depredadores es necesario conocer aspectos generales sobre la biología de la presa y del depredador, así como las condiciones bióticas y las abióticas (por ejemplo, la temperatura) que favorecen el desarrollo adecuado de ambas especies, la selección de la planta hospedera ideal para incrementar el número de individuos, la

respuesta funcional del enemigo natural y la edad de las presas preferida por el depredador, entre otros (Bustos, 2013; Daza Vallejos, Bustos Rodríguez, Cantor Rincón, Rodríguez Caicedo, & Cure Hakim, 2010; De la Peña, Niño, Bustos, Fernando, & Rodríguez, 2011).

El ácaro fitófago *Tetranychus urticae* o arañita roja de los invernaderos afecta más de 150 especies de plantas de interés económico y su hábito alimenticio generalista hace que sea una plaga de difícil manejo, causante de pérdidas económicas importantes cuando no se controla a tiempo (Hilarión et al., 2008). Presenta cinco estadios en su ciclo de vida: huevo, larva, protoninfa, deutoninfa y ácaro adulto. Los huevos son redondos y transparentes, el macho es oblongo y la hembra es más grande y más redondeada (Malais & Ravensberg, 1991).

Una población de *T. urticae* consiste aproximadamente en un 75 % de hembras y un 25 % de machos (3:1). Si las condiciones son favorables, una hembra puede ovipositar más de 100 huevos durante dos semanas a 25 °C. Un solo apareamiento es suficiente para fertilizar todos los huevos. Las hembras fecundadas pueden producir tanto machos como hembras, mientras que las vírgenes solo producen machos (Malais & Ravensberg, 1991).

Tradicionalmente el manejo de poblaciones de esta plaga se realiza mediante la aplicación de productos químicos programada según calendario, los cuales ocasionan impactos en el medio ambiente y en la



Fotos: Stephanie Numa

Figura 14.1. Ácaros depredadores. a. *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot; b. *Neoseiulus californicus* (McGregor); c. *P. persimilis* consumiendo un adulto de *T. urticae*; d. *N. californicus* consumiendo un adulto de *T. urticae*.

salud de los trabajadores encargados. Sin embargo, en algunos cultivos de ornamentales en la sabana de Bogotá es posible encontrar fincas productoras que han cambiado del manejo químico al manejo biológico mediante el uso de ácaros depredadores, dentro de los que se encuentran *Neoseiulus californicus* y *Phytoseiulus persimilis* (Argüelles et al., 2013; Forero, Arguelles, Cantor, & Rodríguez 2010).

A diferencia de *T. urticae*, su enemigo natural, el ácaro depredador *P. persimilis* no tiene un estado de reposo (crisálida) entre los estadios de larva y ninfa. Los huevos son rosados y translúcidos, su forma es ovalada y su tamaño es dos veces mayor que el de *T. urticae*. El ácaro adulto es de tamaño similar a *T. urticae*, tiene color rojo pálido y es muy activo (figura 14.1a). En una población de *P. persimilis*, la proporción de hembras:machos es 4:1, solo las hembras fecundadas pueden poner huevos y lo hacen durante toda su vida. Una hembra adulta de *P. persimilis* puede consumir de 10 a 20 huevos de *T. urticae* por día, oviposita cinco huevos en el mismo periodo y puede colocar hasta 80 huevos en toda su vida. Las ninfas pueden consumir 15 huevos de *T. urticae* por día (Malais & Ravensberg, 1991).

El tiempo que requiere un ácaro para desarrollarse depende de la temperatura, la humedad relativa y el cultivo que se utilice para su sostenimiento. La temperatura en un invernadero en la sabana de Bogotá oscila entre 18-24 °C, con una media de 20 °C. Los ciclos de vida de del ácaro depredador *P. persimilis* y del fitófago *T. urticae* bajo las mismas condiciones de invernadero, que se presentan en la tabla 14.1, muestran que el ciclo de vida de los depredadores es más rápido que el de la plaga, lo cual permite una regulación de la población de la plaga, de la que queda un remanente para alimentar a la progenie del agente biocontrolador (Malais & Ravensberg, 1991).

Tabla 14.1. Comparación de ciclos de vida en días de *T. urticae* y *P. persimilis* a 20 °C

Especie	Huevo	Larva	Protoninfa	Deutoninfa	Total huevo-adulto	Periodo PO*	Total huevo-huevo
T. urticae	6,7	2,8	2,3	3,1	14,9	1,7	16,6
P. persimilis	3,1	1,1	1,4	1,6	7,2	1,9	9,1

* El periodo de preoviposición es el tiempo entre el momento en que se alcanza el estado adulto y el comienzo de la puesta de huevos.

Fuente: Malais y Ravensberg (1991)

Por su parte, el ciclo de vida de *N. californicus* (figura 14.1b) es muy similar al de *P. persimilis*, con una duración de 7,5 días a 25 °C. Este ácaro puede alimentarse de ácaros y de polen. La proporción de hembras en la progenie es de 51,2 %, cada hembra oviposita entre dos y 65 huevos por día durante todo su ciclo de vida. Las ninfas pueden consumir 13 huevos de *T. urticae* en un día (Cantor et al., 2011). La evaluación de la capacidad de consumo dada por la respuesta funcional de *N. californicus* durante una interacción de 24 horas con diferentes densidades de su presa *T. urticae* demostró que cada individuo de *N. californicus* consume diariamente un promedio de cinco huevos, 13 larvas y 16 ninfas bajo condiciones de invernadero, un resultado promisorio para su implementación en condiciones semicomerciales (Forero, Rodríguez, Cantor, Rodríguez, & Cure, 2008).

Producción masiva de ácaros depredadores a escala comercial

En un principio, las liberaciones de ácaros depredadores en el cultivo de rosas eran de 100 a 300 depredadores por cama de 32 m^2, cada cama con dos hileras de plantas en agobio. Esta liberación equivale a una densidad entre 20.000 a 60.000 individuos en un invernadero de 200 camas. El primer tipo de cría que logró este nivel de producción utilizaba bandejas

legumbreras de 50 x 40 x 12 cm en las cuales se sembraban 10 plantas de fríjol por bandeja y hasta 20 bandejas por nave de invernadero. Cuando las plantas alcanzaban las cuatro semanas de edad, se realizaba la liberación de los ácaros fitófagos provenientes de cultivos de rosas, donde habían estado expuestos a diferentes agroquímicos. Después de tres semanas, y al observar una afectación del 70 % del área foliar de las plantas de fríjol, se realizaba la liberación de los ácaros depredadores a razón de 50 adultos por bandeja; al cabo de tres a cuatro semanas, se cosechaban aproximadamente 17.000 ácaros de 20 bandejas. Este esquema de producción se escaló posteriormente a un modelo productivo de 12 semanas siguiendo las fases se describen en la figura 14.2.

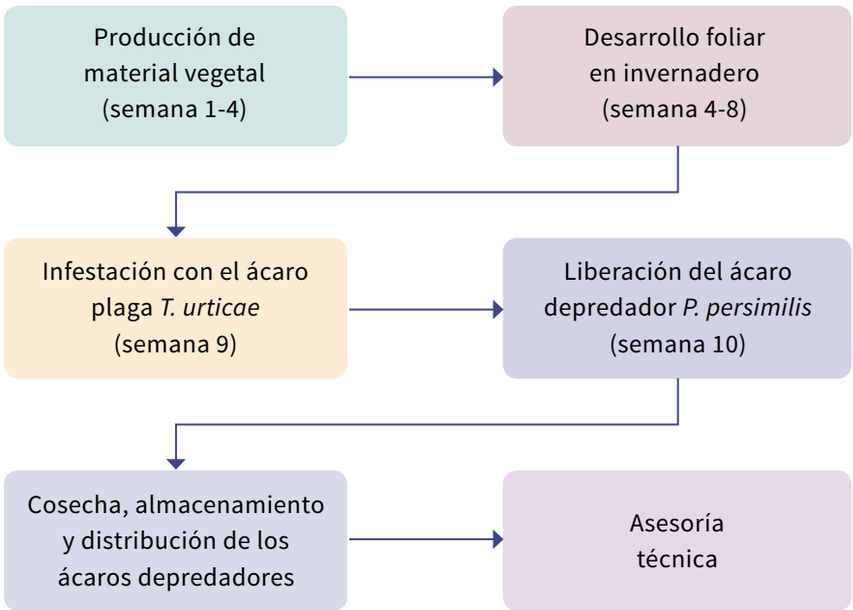


Figura 14.2. Fases de producción masiva de ácaros depredadores en plantas de fríjol.

Fuente: Elaboración propia

Las técnicas para la cría masiva de ácaros depredadores comprenden tres procesos básicos (Scopes & Pickford, 1985):

- Producción de material vegetal *Phaseolus vulgaris*
- Producción del ácaro plaga *Tetranychus urticae*
- Producción del ácaro depredador *Phytoseiulus persimilis*

Producción de material vegetal *Phaseolus vulgaris L.* (semanas 1-8)

La producción masiva de ácaros plaga llevada a cabo en las instalaciones de la empresa Bichopolis S. A. S. se realiza sobre plantas de fríjol *Phaseolus vulgaris* L. de la variedad bola roja, por ser la variedad en la que se presenta una mayor densidad de población de *T. urticae*. Las semillas de fríjol se germinan en un invernadero exclusivo para propagación de plantas limpias. Una vez estas han germinado y se obtiene el segundo par de hojas verdaderas, en aproximadamente cuatro semanas, son llevadas a un invernadero para el desarrollo de área foliar (figura 14.3a). Durante esta fase, las plantas se deben mantener libres de plagas, por lo cual se realizan labores culturales usuales del cultivo de fríjol, incluyendo fertilización, instalación de trampas con pegante de color amarillo y azul para el control de áfidos y trips respectivamente, además de un control de minadores y moscas blancas mediante el uso de una aspiradora industrial, que se efectúa dos veces por semana. Estas prácticas agronómicas se mantienen por un periodo de aproximadamente ocho semanas o hasta la obtención de plantas con una longitud promedio de 80 cm (figura 14.3b).

Fotos: Alexander Escobar

Figura 14.3. Producción masiva de ácaros plaga. a. Propagación de material vegetal para posterior infestación con *T. urticae*; b. Manejo agronómico de plantas de fríjol y desarrollo foliar para la producción de *T. urticae*.

Producción del ácaro plaga *T. urticae* (semana 9)

Para la producción masiva de *T. urticae* se liberan, en las hojas bajeras, algunos de estos ácaros provenientes de plantas de rosa previamente expuestas a acaricidas y a otros agroquímicos. Entre las semanas 9 y 10 se permite la distribución de los individuos en las plantas (figura 14.4a).

Fotos: Alexander Escobar

Figura 14.4. Producción masiva de ácaros plaga. a. Material vegetal infestado con *T. urticae*; b. Plantas de fríjol con adultos de *P. persimilis* listos para la cosecha.

Producción del ácaro depredador *Phytoseiulus persimilis* (semana 10)

Para producir los agentes de control biológico, se introducen los ácaros depredadores en el cultivo y se permite que su población aumente hasta que las plantas presenten un patrón de clorosis, como se muestra en la figura 14.4b. Durante las semanas 9 a 10 se realiza manejo cultural, riego y una adecuada fertilización. Es importante mantener la uniformidad del lote mediante pases. Puede ocurrir que en la cría de *P. persimilis* se presenten también otros depredadores como *N. californicus*, o incluso densidades muy bajas de otros insectos plaga como la mosca blanca de los invernaderos, trips y míridos en menor cantidad, lo cual no representa una amenaza para las poblaciones de *P. persimilis*.

Estrategias de cosecha, almacenamiento y distribución de enemigos naturales

Uno de los pasos clave en la producción y la distribución de enemigos naturales es el proceso de cosecha de los artrópodos, ya que, de acuerdo con la destreza en la manipulación de los individuos, se puede afectar negativamente la viabilidad de los individuos cosechados, debido a daños mecánicos ocasionados por una inapropiada manipulación del material. Adicionalmente, las condiciones de almacenamiento y distribución de los enemigos naturales son de vital importancia al momento de garantizar la supervivencia de los individuos hasta el momento de su liberación en campo. En esta sección se describen detalladamente aspectos a tener en cuenta en los momentos de cosecha, almacenamiento y distribución de ácaros depredadores para garantizar una aplicación adecuada de la estrategia.

Cosecha (semanas 11 y 12)

Los ácaros depredadores producidos son cosechados mecánicamente, por medio de una aspiradora industrial cuyo diseño se mantiene bajo secreto empresarial. El material cosechado es llevado inmediatamente al proceso de limpieza de contaminantes y clasificación del material que se realiza de forma manual (figura 14.5a), lo que garantiza que el material biológico cuente con la calidad ofertada.

Uno de los métodos utilizados en México para cosechar los biocontroladores consiste en esperar a que las hojas comiencen a secarse, momento en el que empiezan a escasear las presas, de forma que los depredadores abandonan naturalmente la planta. Las plantas son cortadas y colocadas dentro de una estructura piramidal, sobre un eje se coloca un contenedor donde se van recogiendo, cada hora, los ácaros que van subiendo atraídos por la luz y luego se cuentan volumétricamente (Rodríguez, Montoya, Pérez-Madruga, & Ramos, 2013).

Almacenamiento

Los ácaros depredadores se empacan en frascos trasparentes con tapa de rosca de 60 y 10 cm^3 de capacidad que contienen aproximadamente 1.000, 2.000 o 4.000 individuos de acuerdo con el momento de la liberación. Si la liberación es masiva, es decir, aquella que se realiza al principio del cultivo para el establecimiento de los depredadores en las plantas, se usarán frascos de 4.000 individuos. Si la liberación es de mantenimiento, la cual se realiza para garantizar una población del enemigo natural en el cultivo, se recomienda el uso de frascos con menor densidad. Como vehículo se usa vermiculita o fibra de coco, que permiten la aireación y la movilidad de los ácaros (figura 14.6). El material es almacenado en cuartos fríos a 8 °C por un periodo entre de 24 a 48 horas máximo hasta su distribución y comercialización. Una vez el material llega a los invernaderos, los ácaros depredadores deben ser liberados en menos de 24 horas para garantizar su efectividad.

Estos productos a base de ácaros depredadores tienen una limitada vida útil, por lo que deben utilizarse en un corto plazo luego de su empaque. Esto es ilustrado por De la Peña et al. (2011), quienes evaluaron el efecto de las condiciones de almacenamiento (8 °C y 85 % de HR) sobre la sobrevivencia, la longevidad, la capacidad devoradora y la fecundidad de *P. persimilis* y *N. californicus*, y encontraron que al cabo de 21 días todos los parámetros biológicos de *P. persimilis* disminuyen, mientras que para *N. californicus* se afectó la sobrevivencia y el consumo de presas y solo hasta los 28 días disminuyó la longevidad y la oviposición.

Criterios para la liberación en campo

El método más empleado para la liberación de estos biocontroladores es el aumentativo, que consiste en liberar periódicamente la mayor cantidad de depredadores posible, sin esperar que se vuelvan parte del ecosistema (Batra, 1982). En cultivos de rosa con una incidencia entre el 30 y el 60 % de ácaros fitófagos, se liberan de 100 a 300 ácaros/cama por semana, haciendo énfasis en los focos de la plaga.

Fotos: Alexander Escobar

Figura 14.5. Proceso de limpieza y empaque del producto. a. Limpieza del material colectado en invernadero: en esta fase se eliminan impurezas aspiradas durante el proceso de cosecha de los ácaros depredadores; b. Proceso de empaque de *P. persimilis*.

Fotos: Alexander Escobar

Figura 14.6. Producto final AcariRaptor®, producido y distribuido por Bichopolis, en envases de 60 cc y 100 cc.

En la literatura se reporta una dosis de liberación de seis a ocho hojas de pepino con *Amblyseius* sp. en un promedio de 100-150 depredadores/hoja por hilera de plantas cuando la población total de fitófagos en el invernadero alcanza un 30 % de severidad (Colcha-Rovalino, 2013).

La tabla 14.2 presenta una escala de uso común para determinar la incidencia de la plaga. Según Hilarión, et al. (2008), cuando las liberaciones se efectúan con previa cuantificación de la plaga y teniendo en cuenta la respuesta funcional del depredador, se logra un control más estable.

Estudios sobre la liberación conjunta de *P. persimilis* y *N. californicus* demostraron que cuando las dos especies se encuentran en el mismo sistema se presenta una disminución en la depredación debido a la interferencia

Tabla 14.2. Escala para la determinación de la incidencia de *T. urticae* en cultivos de ornamentales

Grado	Número de plantas/cama con presencia de *T. urticae*	Ubicación de la plaga
1	1	Tercio medio y bajo de la planta
2	Hasta 3	Tercio medio de la planta
3	5	Tercio bajo de la planta
4	Más de 5	Tercio medio y alto de la planta

Fuente: Elaboración propia a partir de encuestas a productores de ornamentales

entre las especies (comportamiento intraguilda), principalmente en los adultos. La preferencia alimenticia de cada depredador por los estados de *T. urticae* no se ve alterada (Argüelles et al., 2013).

Según Schausberger y Walzer (2001), en condiciones de invernadero se deben hacer liberaciones iniciales de *P. persimilis* con el fin de lograr que la población de la presa decaiga, para, posteriormente, liberar *N. californicus* a fin de que este se mantenga en el cultivo y controle los individuos de la plaga que *P. persimilis* no haya consumido.

Limitantes del sistema de producción

Al intensificar la producción de los ácaros depredadores es usual que se presenten picos de producción, los cuales suelen ser más marcados a medida que se intensifica la cría. En estos casos es prudente descartar los ácaros enfermos por hongos o bacterias, que puedan afectar a la población de benéficos.

Las producciones masivas se realizan en condiciones de invernadero con una infraestructura que permita controlar la temperatura, como manejo de cortinas y techo falso. Climatizar el invernadero en las etapas de infestación con el ácaro depredador o fitófago no es conveniente porque incrementa los costos de producción y los ácaros no resistirán las condiciones climáticas extremas del cultivo al que serán trasladados. El aspecto más crítico en el incremento de la producción de estos benéficos está en la recolección de los ácaros. De acuerdo con el método de cría utilizado, los rendimientos en la producción pueden variar, como se ilustra en la tabla 14.3 en la que se comparan tres métodos de cría masiva con sus correspondientes rendimientos.

Tabla 14.3. Comparativo de métodos de producción masiva de ácaros depredadores en la sabana de Bogotá

Método de producción	Mano de obra	Nº de plantas	Fitófagos móviles/ planta	Depredadores móviles/ planta	Recolección ácaros/hora	Total de depredadores (12 semanas)
Materas	2	480 (80 cm)	50	125	20.000**	200.000
Planta suelo*	3	5760 (lotes de 480 plantas de diferentes edades)	561	32	1.250**	1.000.000
Industrializado*	12	10.000	600	72	1.300.000***	15.000.000

*Datos suministrados por Bichopolis S. A. S.

**Mediante corte de hojas.

***Cosechados con aspiradora industrial.

Fuente: Elaboración propia

Compatibilidad con agroquímicos

A fin de determinar la compatibilidad de los ácaros depredadores con el control químico dirigido principalmente a enfermedades fúngicas, Forero et al. (2010) desarrollaron una prueba biológica que demostró que el metomil (0,5 g L^{-1}) no es compatible con *N. californicus*, mientras que el procloraz (0,6 g L^{-1}),

el bupirimato (1,0 g L^{-1}) y el bifenazate (0,3 g L^{-1}) presentaron una mortalidad promedio del 3 %, por lo que se recomienda el empleo de estos últimos.

A través del tiempo, las empresas comercializadoras de agentes de control biológico (ACB) han evaluado productos que se pueden o no aplicar en un manejo integrado con los depredadores y los han clasificado por rangos de mortalidad entre los depredadores.

Mortalidad del 75-100 %

- Acaricidas: abamectina, bifentrina, bifentrina + amitraz, pirimifos-metil, fipronil+propineb, lambdacialotrina, diafentiuron, tetradifon, fenpiroximato, fenazaquin, milbemectina, amitraz, acrinatrina, pyridaben.
- Insecticidas: imidacloprid, clotiandina, deltrametrina, formetanato, alfacipermetrina, metomil, tiociclam, alfacipermetrina, clorfenapir, fentoato, fipronil, acefato, metiocarb, metomil, clorfenapir, metamidofos, tiocyclam-hidrogenoxalato, monocrotofos, triclorfon.
- Fungicidas: carbendazim, benomil, iprodione, propineb-cymoxanil, iprovalicarb + propineb, tiabendazol, mandipropamid, tebuconazol.

Según Colcha-Rovalino (2013), si el nivel de incidencia de los fitófagos está por encima del 50 % se deben realizar aplicaciones de acaricidas químicos y mantener todas las labores culturales. Las aplicaciones para otros blancos biológicos se deben realizar, en lo posible, dos días antes o dos días después de la liberación y verificar la compatibilidad. Actualmente se pueden descargar aplicaciones móviles que permiten consultar los efectos secundarios de algunos agroquímicos sobre los organismos benéficos que las diferentes comercializadoras producen, como en el caso de Koppert Biological Systems y Biobest Sustainable Crop Management.

Establecimiento

Las limitantes en el establecimiento pueden presentarse debido a factores como las variedades de rosa, la distribución espacial de las plantas, la densidad de follaje, el clima y la residualidad de los productos químicos, dado que los depredadores se ven afectados por los productos aplicados para otros blancos biológicos. Estudios realizados en un sistema controlado por un periodo de tres años en un cultivo de rosa demostraron que ácaros fitófagos *T. urticae* y su enemigo natural *P. persimilis* pueden coexistir durante periodos muy largos, sin requerir liberaciones adicionales ni redistribución artificial de los depredadores (Gough, 1991). Por su parte, Casas y Novoa (2009) encontraron que a mayor número de liberaciones de *P. persimilis*, mayor es la probabilidad de establecimiento; sin embargo, esto siempre va a estar condicionado por la aplicación de productos químicos que no sean compatibles con la estrategia de manejo biológico.

Implementación de ácaros depredadores en la producción de flores: caso Ságaro Flowers S. A.

Ságaro Flowers S. A. cuenta con más de cincuenta años de experiencia en el mercado y ha implementado el uso de ácaros depredadores con resultados contundentes a través de siete años. En la figura 14.7 se observa que el nivel de incidencia de ácaros fitófagos ha disminuido consistentemente a través del tiempo cuando han sido aplicados en un área de producción de rosas en agobio de 42 ha.

Lograr este resultado, en el que se pasó del 59 % de incidencia de la plaga a tan solo un 23 % en siete años, fue posible gracias a un trabajo continuo de seguimiento y consistencia en las decisiones de manejo del cultivo, en el entendimiento de que el uso de ácaros depredadores es netamente preventivo y que un factor decisivo para el éxito de la estrategia es la capacitación a los operarios de cultivo.

Cabe destacar que la condición inicial para liberar ácaros depredadores es que la incidencia de la plaga en el cultivo se encuentre entre el 15 y el 20 %. Si la incidencia es mayor, se deben efectuar aplicaciones químicas con dos meses de anterioridad al inicio de las liberaciones, utilizar productos de baja residualidad y mantener las labores de cultivo.

La recomendación técnica en este caso, donde se presentan 300 plantas/cama, fue iniciar el programa de control biológico con liberaciones masivas semanales con el fin de establecer el ácaro depredador en el cultivo. Adicionalmente, se tienen en cuenta los reportes del monitoreo de poblaciones del ácaro plaga para determinar si se encuentran focos de infestación, en cuyo caso se requieren liberaciones adicionales de refuerzo. El proceso de liberación masiva se realiza por un periodo de dos semanas y posteriormente se realizan liberaciones de mantenimiento de 36 ácaros/cama/semana. Una vez establecido el ácaro en el cultivo, las tasas de liberación son variables de acuerdo con la incidencia de la plaga en este; sin embargo, cada dos semanas se deben realizar liberaciones de mantenimiento de 36 ácaros/cama.

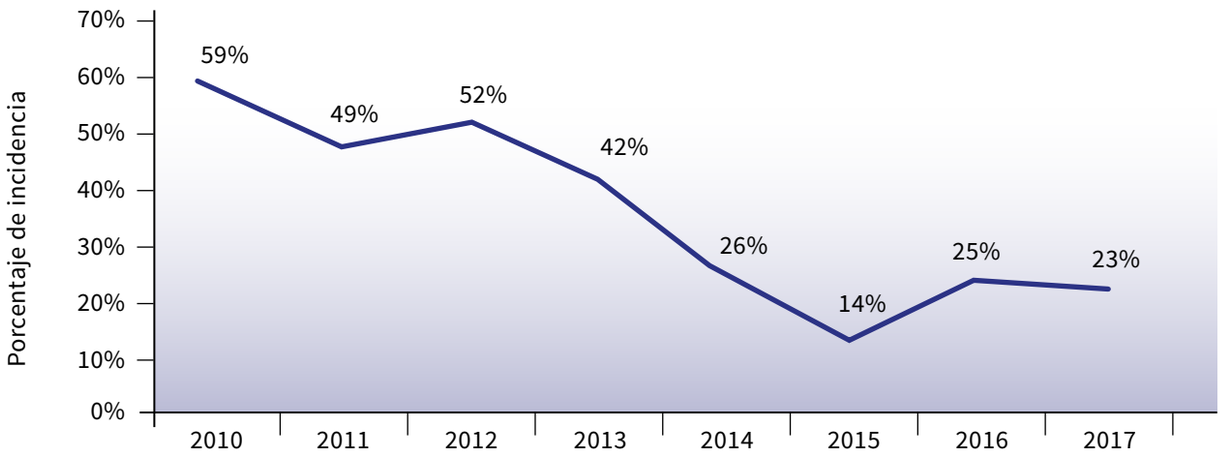


Figura 14.7. Efecto de los ácaros depredadores *P. persimilis* sobre el porcentaje de incidencia del ácaro *T. urticae* en un cultivo de rosa durante el periodo 2010-2017 en la empresa Ságaro Flowers S. A.

Fuente: Elaboración propia

En la fase de establecimiento se debe efectuar seguimiento semanal, y, una vez se tenga un control consistente, los muestreos se pueden llevar a cabo con una frecuencia mensual o incluso más espaciados, según el caso. La proporción entre fitófagos y depredadores establecida por Ságaro Flowers S. A. fue de 20:1, y se considera que la presencia de huevos viables y de otros estadios del biocontrolador son indicadores de un buen establecimiento, lo cual se cumplió en este caso.

La disminución en la incidencia de los ácaros en rosas tuvo un impacto en el indicador de consumo de agroquímicos por área de cultivo (figura 14.8), aunque uno de los efectos no esperados fue el aumento de las poblaciones de trips. Sin embargo, los datos no son suficientes para atribuirlo exclusivamente al manejo con depredadores, dado que las poblaciones de trips suelen variar por migraciones y por condiciones climáticas (Flores & Corredor, 2000).

El manejo de esta condición obligó al empleo de control químico, con el consecuente impacto en el indicador de ingrediente activo por hectárea y la necesidad de inundar nuevamente varios invernaderos cuyas poblaciones de depredadores fueron afectadas.

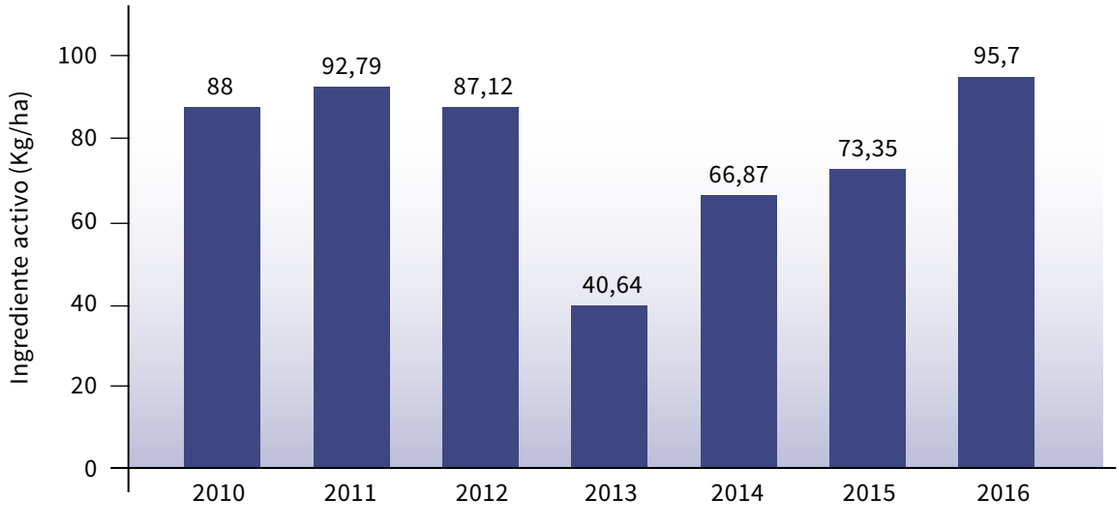


Figura 14.8. Consumo de ingrediente activo en kg/ha al año en la finca de rosas Ságaro Flowers S. A. de la sabana de Bogotá donde se ha implementado el control biológico de ácaros mediante liberaciones periódicas de los depredadores *P. persimilis*.

Fuente: Elaboración propia

Los costos asociados al manejo de plagas y enfermedades en el cultivo de rosa mediante la aplicación de diferentes productos químicos durante el periodo 2009-2017 demostraron que la implementación gradual del control biológico con ácaros depredadores aumentó del 4 % en el 2012 al 11 % en 2017, mientras que los acaricidas se redujeron del 32 al 14 % en el mismo periodo (figura 14.9). Esto implica que la implementación del control biológico no representa un incremento significativo en los costos de producción, y sí favorece el medio ambiente al reducir las aplicaciones químicas. El éxito en la implementación de esta estrategia de control biológico también ha generado un impacto positivo en el personal del cultivo, ya que se han evidenciado los resultados y se perciben los beneficios a nivel ambiental.

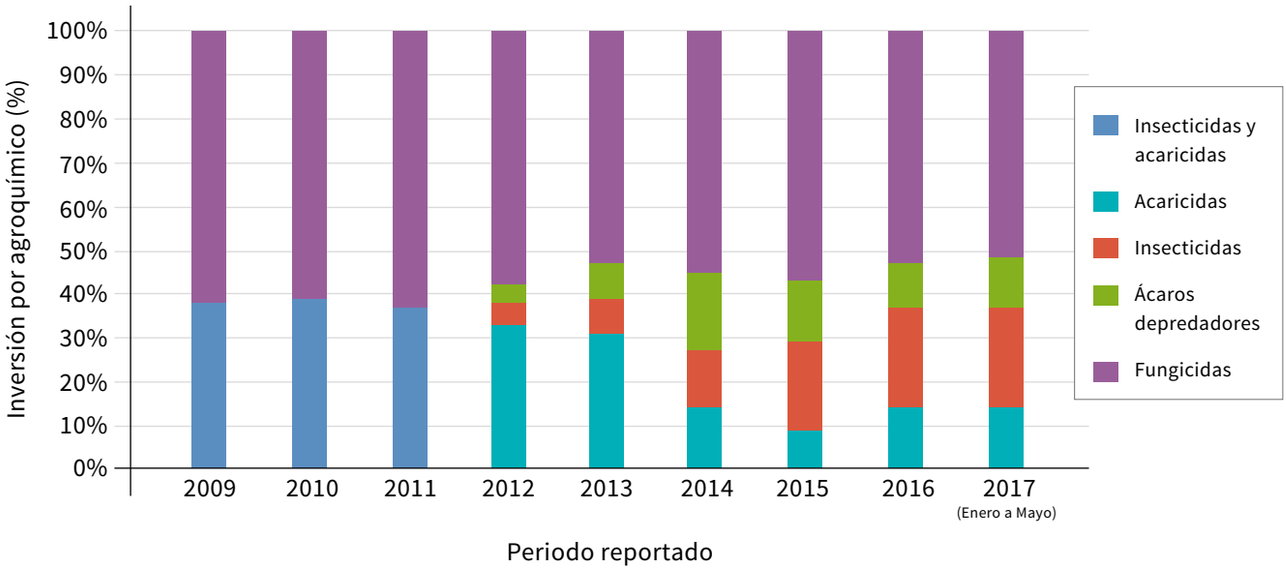


Figura 14.9. Porcentaje de costos asociados a las diferentes estrategias de manejo de insectos plagas y de enfermedades en cultivo de rosas en el periodo 2009-2017.

Fuente: Elaboración propia

Regulación internacional para la implementación del control biológico de plagas mediante la liberación de enemigos naturales

La implementación de estrategias de control biológico de plagas mediante el uso de enemigos naturales se encuentra regulada internacionalmente para garantizar el manejo apropiado de la biodiversidad en los países donde se desee aplicar la tecnología, así como para proteger los diferentes ecosistemas frente a potenciales amenazas a la biodiversidad. En esta sección se resumen algunas regulaciones que se deben tener en cuenta desde el momento de la búsqueda de enemigos naturales hasta su implementación comercial. Así mismo, se describen algunas de las limitantes que enfrentan los productores de enemigos naturales en el proceso de registro y comercialización de sus productos en Colombia.

Global G.A.P.

Las cadenas de supermercados, los agricultores y los especialistas en protección de cultivos colaboran con la implementación de los lineamientos del certificado emitido por Global G.A.P., una entidad privada que se encarga de certificar, alrededor del mundo, a los productores que cumplen con los lineamientos establecidos para una producción con bajos residuos de productos químicos, por lo tanto, esta es una de las normas más restrictivas en cuanto a los residuos de agroquímicos (Global G.A.P., 2017). Este tipo de regulación ha incrementado el número de productores que se han adherido a la norma debido a las ventajas que le confiere al productor en términos de ampliación de su nicho de mercado, pues la demanda de productos libres de residuos químicos está en crecimiento (Van Lenteren, 2012).

Convenio sobre la diversidad biológica

El convenio sobre la diversidad biológica es un tratado internacional jurídicamente vinculante con tres objetivos principales: la conservación de la diversidad biológica, la utilización sostenible de sus componentes y la participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de la utilización de los recursos genéticos (Naciones Unidas, 1992).

Este convenio establece los derechos soberanos de cada país sobre los recursos genéticos dentro de sus límites territoriales. Así mismo, establece que los acuerdos que gobiernan el acceso a los recursos genéticos y los beneficios compartidos, resultado del uso de la mencionada biodiversidad, deben ser establecidos entre los países interesados (Cock et al., 2010).

Esta regulación le confiere a cada país su independencia para establecer las normas para la importación y la exportación de material genético, por lo tanto, el ente regulador en cada país es libre de conceder o negar permisos de importación de este tipo de material, lo cual afecta directamente el desarrollo y la implementación de programas de control biológico de plagas mediante el uso de especies de artrópodos importadas. En Colombia, el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) y la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA) son los entes encargados de otorgar los permisos a las empresas productoras de agentes de control biológico para la producción y la liberación de enemigos naturales en los campos de producción del país. Así mismo, son quienes se encargan de analizar las solicitudes de importación de artrópodos para su uso en el control biológico.

Acuerdo de acceso y beneficio compartido

El control biológico aumentativo es una actividad comercial que implica la liberación a gran escala y de manera regular de agentes biocontroladores producto de crías masivas de insectos benéficos (Van Lenteren, 2012). Para llegar al punto de una producción a escala comercial de enemigos naturales es necesario haber cumplido con ciertos requisitos de viabilidad del producto, comenzando con la colecta en campo

de potenciales enemigos naturales, su estudio y la evaluación de su efectividad, lo que posteriormente llevará al desarrollo y el registro del enemigo natural para su comercialización (Van Lenteren, Bolckmans, Köhl, Ravensberg, & Urbaneja, 2018). Uno de los factores que se debe tener en cuenta al momento de registrar un producto de origen biológico para el manejo de plagas en diferentes cultivos en cualquier país es si su origen es endémico o si, por el contrario, se trata de una especie que debe ser importada. Para el segundo caso, se deben considerar las normas internacionales que hacen referencia al uso de recursos genéticos y beneficios compartidos que se describen a continuación.

El protocolo de Nagoya sobre el acceso y beneficio compartido (Nagoya Protocol on ABS [Access and Benefit Sharing]) se refiere a la manera en que se puede acceder a los recursos genéticos, y cómo los beneficios que son resultado del uso de dichos recursos son compartidos entre las personas o los países usuarios del recurso y los países o las personas proveedores del recurso (Cock et al., 2010; Convention on Biological Diversity [ABS], 2010). Los beneficios del uso de estos recursos pueden ser monetarios, como cuando el uso es destinado a los productos comerciales, mientras que los beneficios no monetarios pueden incluir la oferta de conocimiento o de habilidades de investigación. Para poder acceder a este acuerdo entre diferentes países es necesario cumplir con dos pasos importantes: el primero es el *consentimiento informado previo*, que es el permiso dado por la autoridad nacional competente del país proveedor a un usuario antes de acceder al recurso genético. En segundo lugar, se encuentran *los términos de acuerdo mutuo* que son acordados entre las partes (proveedor y usuario) y se refieren a las condiciones para el acceso y el uso del recurso y los beneficios que serán compartidos por las partes (ABS, 2010).

Proceso de registro y comercialización de enemigos naturales en Colombia

El registro de producción y venta de bioinsumos de uso agrícola en Colombia está regulado por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) mediante la Resolución 698 del 4 de febrero del 2011. El proceso incluye la autorización del productor o importador y el registro de venta del producto. Dentro de los requisitos establecidos por esta resolución para el registro del productor se destacan:

- El solicitante debe demostrar su constitución legal mediante certificado de existencia y representación legal, si se trata de una persona jurídica, o matrícula mercantil si es persona natural. Se debe contar con una planta de producción y un laboratorio de control de calidad propio o demostrar un contrato con un tercero.
- Es necesario describir la operación en cada una de las etapas que se desarrollan en las áreas de proceso y los equipos que se utilizan.
- Se requiere la obtención de una licencia ambiental, según el Decreto 2041 de octubre 15 de 2014 del Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Comprende una fase experimental que involucra la importación, la evaluación de la eficacia del producto y su posible impacto sobre los ecosistemas. El estudio de impacto ambiental debe ser elaborado de acuerdo al Artículo 21 de dicho decreto.
- Certificado de uso del suelo de las instalaciones emitido por la oficina de planeación municipal o la autoridad competente; debe ser un área que sea destinada para uso agrícola.
- Concepto de salubridad pública expedido por la autoridad competente.
- Relación de los productos que está en capacidad de producir, importar o evaluar, donde se indique el tipo de formulación o la presentación de cada uno.
- Contar con un laboratorio de control de calidad registrado en el ICA o contratar los servicios de uno que cumpla con los lineamientos del ICA.
- Presentar un plan de análisis de control de calidad en el que se especifique el porcentaje de muestras por cada lote elaborado; la frecuencia de muestreo varía dependiendo los lotes producidos o importados.

- Contar con un director técnico profesional en el área.
- Para el caso de los importadores, se deben especificar las características físicas, biológicas y químicas del producto e identificar la especie que se va a importar, su género y aportar la correspondiente información técnica.

Para obtener el registro del producto, ya sea para uso propio o para comercialización, debe estar registrado ante ICA como importador o productor y cumplir los siguientes requisitos:

- Presentar un informe final del ensayo de eficacia con las recomendaciones de uso. Dicho ensayo debe efectuarse según un protocolo aprobado por el ICA antes de su ejecución.
- Entregar el material de referencia al Laboratorio Nacional de Insumos Agrícolas (LANIA) del ICA y explicar cómo se identifica el depredador.
- En el caso de depredadores, no aplica el requerimiento de concepto toxicológico.
- Proyecto de etiquetado.
- El requerimiento de una prueba de estabilidad del producto no aplica para los depredadores, dado que son organismos vivos.
- Métodos de análisis de la actividad biológica.
- Hoja de manejo del producto.
- Certificado de marca expedido por la Superintendencia de Industria y Comercio.
- En caso de ser productor por maquila, debe adjuntar el contrato de producción con otra empresa registrada ante ICA.
- Características morfológicas del organismo.
- Medios de propagación y condiciones óptimas para el desarrollo.
- Especie agronómica para la cual se recomienda el uso.
- Plaga a controlar.
- Restricciones de uso.
- Descripción para la eliminación de productos vencidos o fuera de especificaciones técnicas.
- Para productos importados, autorización del productor para su comercialización en Colombia; debe incluir el certificado de análisis del mismo.
- Certificado de libre venta en el país de origen.

Nicho de mercado de enemigos naturales en Colombia

Las compañías dedicadas a la producción de enemigos naturales en Colombia se encuentran ubicadas en su mayoría en el departamento del Valle del Cauca, donde el manejo biológico de las plagas se realiza principalmente mediante liberación aumentativa de parasitoides de *Trichogramma* spp. en cultivos de caña de azúcar para el manejo de *Diatraea* sp. (Instituto Colombiano Agropecuario, 2017a, 2017b). Este mercado de parasitoides constituye el 42,85 % de los productos comercialmente disponibles para la agricultura colombiana, frente a un mercado del 57,14 % cubierto por los artrópodos depredadores, los cuales son producidos tanto en el Valle como en la sabana de Bogotá para su comercialización en cultivos de ornamentales bajo invernadero. En total son nueve compañías, de las cuales el 67 % se dedica a la producción de los insectos en Colombia y el 33 % restante realiza su mercado a partir de la importación de los agentes de control biológico (tabla 14.4).

Limitantes de la adopción de la tecnología

Existen casos exitosos de uso de ácaros depredadores, pero, como en cualquier proceso de adopción de tecnología, su implementación depende enormemente de factores culturales.

El usuario de la tecnología debe estar en capacidad de entender cómo incorporarla a su sistema productivo y

Tabla 14.4. Empresas dedicadas a la producción o la importación de enemigos naturales en Colombia registradas ante el Instituto Colombiano Agropecuario

Razón social	Especie	Actividad	N.° de resolución
Bichopolis S. A. S.	*Phytoseiulus persimilis*	Productor	1352
Koppert Colombia S. A. S.	*Phytoseiulus persimilis* *Neoseiulus californicus*	Importador	4205
Biocol	*Chrysoperla carnea* *Trichogramma exiguum*	Productor	3459
Surtir de la Sabana Ltda.	*Phytoseiulus persimilis*	Importador	2137
Syngenta	No registra producto	Importador	2160
Biodefensas Agrícolas Ltda.	*Trichogramma* spp.	Productor	287
Corporación Ama	*Trichogramma exiguum*	Productor	3457
Perkins Ltda.	*Trichogramma pretiosum* *T. atopovirilia* *T. exiguum* *Chrysoperla carnea*	Productor	4425
Scientia Colombia S. A. S.	*Trichogramma pretiosum* *T. exiguum* *T. atopovirilia* *Encarsia formosa* *Eretmocerus eremicus* *Aphidius colemani* *Orius insidiosus* *Ceraeochrysa claveri* *Ceraeochrysa cincta* *Chrysoperla carnea* *Phytoseiulus persimilis* *Neoseiulus californicus* *Neoseiulus cucumeris*	Productor	5877
Bioagro	*T. pretiosum* *T. exiguum* *T. atopovirilia*	Productor	4631

Fuente: Adaptado de ICA (2017a, 2017b)

cómo combinarla con otros métodos de los cuales no puede prescindir, como el control químico de otras plagas y enfermedades, cuyo efecto colateral puede fácilmente estropear el programa de implementación. De acuerdo con la experiencia de los autores, los obstáculos más importantes para la adopción de estas tecnologías son los siguientes.

Regulación gubernamental

Un factor limitante en la aplicación del control biológico de plagas en Colombia, expresado por compañías extranjeras que quieren entrar en el mercado colombiano, radica en la complejidad de los lineamientos que regulan la importación de enemigos naturales

y de las liberaciones en campo de estos agentes de control biológico. La mayoría de las regulaciones establecidas para Colombia son muy similares a las que se pueden encontrar en Europa. Sin embargo, el registro de agentes de control biológico en Colombia debe realizarse con un nivel alto de rigor para evitar impactos en los ecosistemas ocasionados por especies foráneas, y la determinación de los impactos potenciales se efectúa con un estudio complejo que toma tiempo en un país megadiverso.

Tiempos desde la producción hasta puesta en campo

Los agentes de control biológico son organismos vivos que necesitan ser colectados en campo, estudiados, criados masivamente y transportados al país receptor en un tiempo que permita, una vez liberados, garantizar su viabilidad y su efectividad. Los tiempos en los que deben ocurrir estos pasos deben reducirse al mínimo durante los trámites que realizan las autoridades de importación; sin embargo, diferentes empresas que han intentado incluir sus productos en el mercado colombiano han reportado que los tiempos de chequeo del material en los aeropuertos y las condiciones en las que los productos son mantenidos durante la espera de la inspección por parte de las autoridades no son adecuados para el manejo de material vivo, lo cual afecta la viabilidad del producto y hace que disminuya la credibilidad en este por motivos que, generalmente, son ajenos a la biología de los insectos. El proceso de registro y llegada al mercado de la tecnología es largo, de modo que puede afectar la demanda y el interés de las empresas en establecer este tipo de operaciones.

Aceptación por parte de los agricultores

Regularmente, para implementar estrategias de control biológico en cultivos comerciales se requiere de personal altamente entrenado para la producción masiva de los artrópodos, lo cual puede generar un costo adicional para el productor. Por otro lado, para garantizar la supervivencia de los enemigos naturales se hace necesario separar temporal y espacialmente las aplicaciones de agroquímicos. Lo anterior dificulta la aplicación de una única estrategia de manejo en el cultivo e implica que se debe tener un plan de operaciones para mantener alejados los lotes tratados con químicos de los tratados con depredadores.

La aceptación de la tecnología por parte de los agricultores se ve en riesgo cuando se requiere asistencia técnica para generar capacidades en las operaciones de producción de flores a fin de interpretar correctamente los umbrales de daño y definir las intervenciones, tanto para la aplicación de agroquímicos como para la liberación de ácaros depredadores.

Actitud de los consumidores finales

Se considera que los consumidores finales de productos agrícolas tienen una mayor preferencia hacia los cultivos manejados mediante control biológico que hacia los manejados con control químico. Sin embargo, este tipo de tendencias no se encuentran documentadas apropiadamente (Van Lenteren, 2012). En Colombia, no se cuenta con estadísticas que permitan conocer la preferencia del consumidor en cuanto a la inocuidad de los productos agrícolas disponibles en el mercado.

Conclusiones y perspectivas

Los artrópodos benéficos se consideran parte del mercado de bioinsumos, junto con los plaguicidas microbianos y los plaguicidas bioquímicos. Este mercado tiene un alto potencial de crecimiento hacia 2020 (Goedde, Horii, & Sanghvi, 2015) y Colombia, como país megadiverso, tiene grandes oportunidades de encontrar y desarrollar nuevas alternativas de control que involucren el uso de artrópodos. El uso de ácaros depredadores en los cultivos de rosas es un caso exitoso a pesar de múltiples factores en contra, donde cabe mencionar la falta de tradición en el uso de esta alternativa y la alta dependencia del control químico. Como cualquier alternativa tecnológica, el uso de artrópodos depredadores está sujeto a la oferta y la demanda. Por el lado de la oferta, los productores de enemigos naturales a escala comercial en Colombia aún son pocos, pero han tenido un proceso de aumento en su capacidad de producción y de profesionalización empresarial. La alta demanda de estas alternativas en Europa ha sido estimulada por la necesidad de generar productos agrícolas con alto valor agregado y buenos estándares de inocuidad, aspectos que cada día cobran más importancia en el mercado. En la medida de que estos mercados agrícolas de alto valor se desarrollen y consoliden, se crearán espacios para nuevas empresas dedicadas a la producción masiva y la comercialización artrópodos benéficos, lo cual hace necesario un alto grado de articulación entre el Estado, la academia, el emprendimiento productivo y los demandantes de la tecnología a nivel local e internacional.

Agradecimientos

Los autores expresan un especial agradecimiento a Ságaro Flowers S. A., quienes, por medio de comunicación personal con el Ing. Leonardo Ramos, autorizaron la publicación de los datos consignados en el presente estudio de caso.

Referencias

Argüelles, A., Plazas, N., Bustos, A., Cantor, F., Rodríguez, D., & Hilarion, A. (2013). Interacción entre dos ácaros depredadores de *Tetranychus urticae* Koch (Acariformes: Tetranychidae) en laboratorio. *Acta Biológica Colombiana, 18*(1), 137-148. Recuperado de https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/16291.

Asociación Colombiana de Exportadores de Flores (Asocolflores), Sociedad de Agricultores de Colombia (SAC) & Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial (MAVDT). (2006). *Lineamientos y recomendaciones para el programa social y ambiental Flor Verde en el marco de las evaluaciones ambientales estratégicas segun metodologia del departamento nacional de planeación*. Recuperado de http://www.minambiente.gov.co/images/AsuntosambientalesySectorialyUrbana/pdf/Evaluación_Ambiental_Estrategica/Lineamientos__recomendaciones_flor_verde.pdf.

Batra, S. W. (1982). Biological control in agroecosystems. *Science, 215*(4529), 134-139. doi:10.1126/science.215.4529.134.

Bustos, H. A. (2013). *Desarrollo de un modelo de simulación de una cría masiva del ácaro depredador Phytoseiulus persimilis (Parasitiformes: Phytoseiidae)* (tesis de maestría). Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, Colombia. Recuperado de http://repository.unimilitar.edu.co/bitstream/10654/12444/1/Bustos%20Alexander%20codigo_7500027.pdf.

Cantor, F., Rodríguez, D., Bustos, A., Hillarion, A., Muñoz, K., Niño, A., & Numa, S. (2011). *Estrategias para el control integrado de ácaros en cultivos de rosa*. [Cartilla técnica]. Bogotá, Colombia: Centro de Innovación de la Floricultura Colombiana (Ceniflores).

Casas, Y., & Novoa, M. A. (2009). *Evaluación del establecimiento de Phytoseiulus persimilis (Parasitiformes:Phytoseiidae) para el control de Tetranychus urticae-Koch (Acari: Tetranychidae) en rosa* (tesis de pregrado). Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, Colombia. Recuperado de http://repository.unimilitar.edu.co/bitstream/10654/455/1/CasasPrietoYuly2009.pdf.

Cock, M. J., Van Lenteren, J. C., Brodeur, J., Barratt, B. I., Bigler, F., Bolckmans, K., … Parra, J. R. P. (2010). Do new access and benefit sharing procedures under the convention on biological diversity threaten the future of biological control? *BioControl, 55*(2), 199-218. doi:10.1007/s10526-009-9234-9.

Colcha-Rovalino, S. E. (2013). *Manual práctico de reproducción masiva de Amblyseius californicus, usado en el control biológico de Tetranychus urticae* (tesis de grado). Universidad Politécnica Salesiana sede Quito, Quito, Ecuador. Recuperado de https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/6049/1/UPS-YT00145.pdf.

Chacón-Hernandez, J., Cerna-Chávez, E., Ochoa-Fuentes, Y., Hernández-Juárez, A., Palacios-Bazaldúa, L., & Landeros-Flores, J. (2016). Distribución espacial y fluctuación poblacional de *Tetranychus urticae* (Koch) y *Phytoseiulus persimilis* (Athias-Henriot) en cultivos de rosal. *Phyton, 85*(2), 236-245. Recuperado de http://www.revistaphyton.fund-romuloraggio.org.ar/vol85/Chacon_Hernandez.pdf.

Convention on Biological Diversity (ABS). (2010). *Introduction to access and benefit-sharing*. Recuperado de https://www.cbd.int/abs/infokit/brochure-en.pdf.

Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE) (2010). *Informe de resultados. Censo de fincas productoras de flores en 28 municipios de la sabana de Bogotá y Cundinamarca*. Recuperado de http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/boletines/flores/Informe_resultados_2009.pdf.

Daza Vallejos, M. A., Bustos Rodríguez, H. A., Cantor Rincón, F., Rodríguez Caicedo, D., & Cure Hakim, J. R. (2010). Criterios para la producción de *Phytoseiulus persimilis* (Parasitiformes: Phytoseiidae) bajo condiciones de invernadero. *Acta Biológica Colombiana, 15*(1), 37-46.

De la Peña, A., Niño, P., Bustos, A., Fernando, C., & Rodríguez, D. (2011). Efecto de diferentes tiempos de almacenamiento en frío sobre algunos parámetros de *Phytoseiulus persimilis* (athias henriot) y *Neoseiulus californicus* (parasitiformes: phytoseiidae). *Acta Biológica Colombiana, 16*(2), 63-74.

Flores, E., & Corredor, D. (2000). Análisis espacial de las poblaciones de *Frankliniella occidentalis* (Pergande) en un cultivo de fresa bajo cubierta, como soporte de las decisiones de manejo integrado de plagas. *Agronomía Colombiana, 17*(1-3), 25-35. Recuperado de http://www.bdigital.unal.edu.co/24388/1/21541-73647-1-PB.pdf.

Forero, G., Rodríguez, M., Cantor, F., Rodríguez, D., & Cure, J. R. (2008). Criteria for the management of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) with the predator mite *Amblyseius* (Neoseiulus) sp. (Acari: Phytoseiidae) on rose culture. *Agronomía Colombiana*, *26*(1), 78-86.

Forero, J., Arguelles, Z. P., Cantor, F., & Rodríguez, D. (2010). Bioensayo para evaluar la compatibilidad de adultos de *Neoseiulus californicus* (Parasitiformes: Phytoseiidae) con algunos pesticidas de uso comercial en condiciones semicontroladas. *Agronomía Colombiana*, *28*(2), 273-280.

Global G.A.P. (2017). *Certification*. Recuperado de http://www.globalgap.org/uk_en/what-we-do/globalg.a.p.-certification/.

Goedde, L., Horii, M., & Sanghvi, S. (2015). *Pursuing the global opportunity in food and agribusiness*. Recuperado de https://www.mckinsey.com/industries/chemicals/our-insights/pursuing-the-global-opportunity-in-food-and-agribusiness.

Gómez, S., Pérez, M., Barreto, C., Cure, J., & Torrado, E. (2004). Introducción del depredador *Phytoseiulus persimilis* como componente del manejo integrado de la arañita roja *Tetranychus urticae*. *Revista Asocolflores*, *65*, 43-58.

Gough, N. (1991). Long-term stability in the interaction between *Tetranychus urticae* and *Phytoseiulus persimilis* producing successful integrated control on roses in southeast Queensland. *Experimental & Applied Acarology 12*(1-2), 83-101. doi:10.1007/BF01204402.

Hilarión, A., Niño, A., Cantor, F., Rodríguez, D., & Cure, J. R. (2008). Criterios para la liberación de *Phytoseiulus persimilis* Athias Henriot (Parasitiformes: Phytoseiidae) en cultivo de rosa. *Agronomía Colombiana*, *26*(1), 68-77.

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (4 de febrero de 2011). Por medio de la cual se establecen los requisitos para el registro de departamentos técnicos de ensayos de eficacia, productores e importadoes de bioinsumos de uso agrícola y se dictan otras disposiciones. [Resolución 698]. Recuperado de https://www.ica.gov.co/getattachment/225bd110-d1c4-47d7-9cf3-43745201e39a/2011R698.aspx.

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2017a). *Empresas bioinsumos diciembre 2017*. Recuperado de https://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Fertilizantes-y-Bio-insumos-Agricolas/Listado-de-Bioinsumos/2009/EMPRESAS-REGISTRADAS-BIOINSUMOS-JULIO-8-DE-2008.aspx.

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) (2017b). *Productos registrados*. Recuperado de http://www.ica.gov.co/getdoc/2ad9e987-8f69-4358-b8a9-e6ee6dcc8132/PRODUCTOSBIOINSUMOS-MAYO-13-DE-2008.aspx.

Malais, M., & Ravensberg, W. (1991). *Conocer y reconocer: la biología de las plagas de invernadero y sus enemigos naturales*. Berkel en Rodenrijs, Holanda: Koppert Biological Systems.

McMurtry, J., & Croft, B. (1997). Life-styles of phytoseiid mites and their roles in biological control. *Annual Review of Entomology*, *42*, 291-321. doi:10.1146/annurev.ento.42.1.291.

Naciones Unidas (1992). *Convenio sobre la biodiversidad biológica*. Recuperado de https://www.cbd.int/doc/legal/cbd-es.pdf.

Peñaranda, M. I. (2016). *Resistencia de insectos a insecticidas*. Recuperado de http://www.metroflorcolombia.com/resistencia-de-insectos-a-insecticidas/.

Rabobank Group (2016). *World floriculture map*. Recuperado de https://research.rabobank.com/far/en/sectors/regional-food-agri/world_floriculture_map_2016.html.

Rodríguez, H., Montoya, A., Pérez-Madruga, Y., & Ramos, M. (2013). Reproducción masiva de ácaros depredadores Phytoseiidae: retos y perspectivas para Cuba. *Revista de Protección Vegetal*, *28*(1), 12-22.

Rojas López, M. D. R., Vera, M., & Arias, M. I. (2012). Estrategia de CRM en el caso de las empresas colombianas de bioinsumos. *Gestión y Ambiente*, *15*(2), 93-100.

Scopes, N. E. A., & Pickford, R. (1985). Mass production of natural enemies. En N. W. Hussey & N. E. A. Scopes (Eds.), *Biological Pest Control: The Glasshouse Experience* (pp. 197-209). Poole, Reino Unido: Blandford Press.

Schausberger, P., & Walzer, A. (2001). Combined versus single species release of predaceous mites: predator-predator interactions and pest suppression. *Biological Control*, *20*(3), 269-278. doi:10.1006/bcon.2000.0908.

Torrado, E., Pérez, M., Cure, J., García, M., & Echeverri, C. (2001). Evaluación de sistemas de control biológico utilizados comercialmente en Europa para el control de plagas de rosa bajo invernadero, en la sabana de Bogotá. *Revista Asocolflores*, *61*, 34-45.

Van Lenteren, J. C. (2012). The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. *BioControl*, *57*(1), 1-20. doi:10.1007/s10526-011-9395-1.

Van Lenteren, J. C., Bolckmans, K., Köhl, J., Ravensberg, W. J., Urbaneja, A. (2018). Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl*, *63*(1), 39-59. doi:10.1007/s10526-017-9801-4.

Zambrano, C. & Riaño, P. (2008). *Rentabilidad de las empresas productoras de bioinsumos registradas ante el ICA*. Recuperado de http://argus.iica.ac.cr/Esp/regiones/andina/colombia/Documentos%20de%20la%20Oficina/docsiica/rentabilidad_empresas_bioinsumo_ica.pdf.

Zambrano, D. C., Bonilla, R. R., Avellaneda, L., & Zambrano, G. (2015). Análisis prospectivo de los bioinsumos agrícolas en Colombia: una consulta a expertos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *17*(2), 103-113. doi:10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.48472.

Capítulo 15

Investigación, desarrollo y escalamiento de feromonas de insectos

Chapter 15

Research, development and scaling of insect pheromones

Felipe Borrero-Echeverry[1]

[1] Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA)

Contenido

Introducción 746

Desarrollo de bioensayos 747

Aislamiento de feromonas 748

Caracterización y síntesis de feromonas 751

Formulación 753

Validación 757

Agradecimientos 757

Referencias 758

Resumen

Durante los últimos 50 años las feromonas se han establecido en el mercado como componentes fundamentales de las estrategias de manejo integrado de plagas y de vigilancia fitosanitaria. El proceso de investigación y desarrollo de las feromonas para el control de insectos fue establecido en la década de los setenta y ha cambiado poco desde entonces. Este proceso se basa en el desarrollo de bioensayos, el aislamiento de feromonas, la caracterización e identificación de los compuestos que hacen parte de estas, la síntesis química de los compuestos, su formulación y la validación en condiciones de laboratorio y de campo. Este capítulo reseña este proceso y menciona los métodos más comunes que se utilizan en la actualidad.

Palabras clave

Aislamiento de feromonas, análisis y síntesis químico, bioensayos, dispensadores de feromona, formulación

Abstract

Over the past 50 years pheromones have become established in the market as integral parts of integrated pest management, and phytosanitary vigilance programs. The research and development process for the development of insect pheromones for pest control was established in the 70s and has remained mostly the same since. This procedure is based on the development of bioassays, the extraction of the pheromone, it's characterization and identification of the chemical compounds, the synthesis of these compounds, their formulation into appropriate dispensers, and finally, its validation under laboratory and field conditions. This chapter provides an overview of this process and the most common methods used to date.

Keywords

Bioassays, chemical analysis and synthesis, formulation, pheromone dispensers, pheromone isolation

Introducción

Las feromonas son compuestos químicos utilizados por organismos (en este caso, insectos) en la comunicación intraespecífica (ver Capítulo 8 para más información sobre las feromonas y sus usos en el control de plagas). Desde la caracterización de la primera feromona —la del gusano de la seda *Bombyx mori*, por Adolf Butenandt en 1959 (Butenandt, Beckmann, Stamm, & Hecker, 1959)—, el proceso de investigación y desarrollo de feromonas ha cambiado poco, a pesar de los grandes desarrollos tecnológicos. A grandes rasgos, el proceso consiste en el desarrollo de un bioensayo confiable, el aislamiento de la feromona, su caracterización química, su verificación, síntesis, formulación y validación en laboratorio y en campo. A continuación, se describe el proceso paso a paso (figura 15.1).

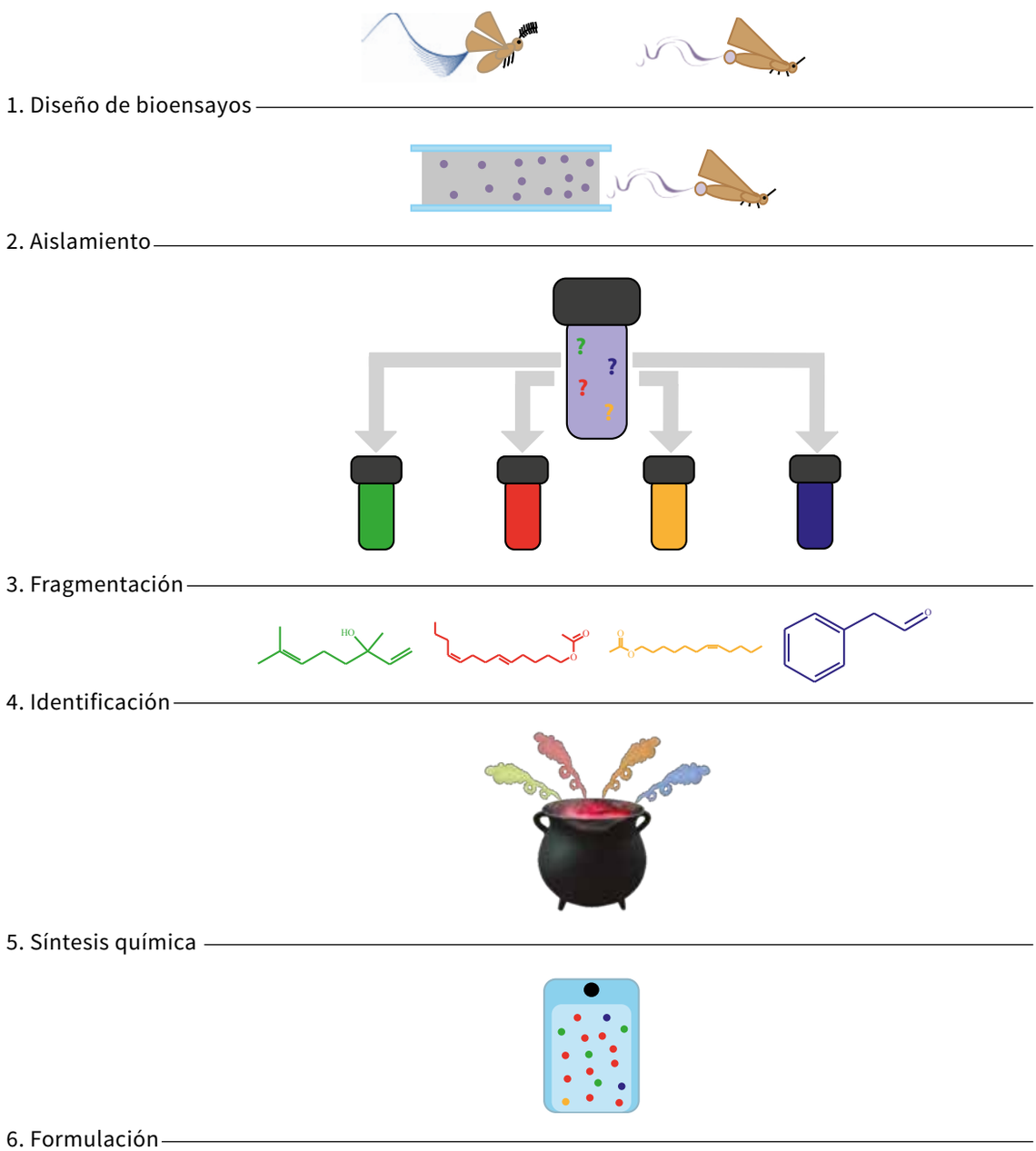


Figura 15.1. Esquema simplificado del proceso de investigación y desarrollo de feromonas.

Fuente: Elaboración propia

Desarrollo de bioensayos

El bioensayo —primer paso en la investigación y desarrollo de las feromonas— es también uno de los procedimientos más importantes a lo largo del desarrollo de estas, pues es, además, el método de verificación de su funcionamiento. El diseño de los bioensayos depende de la biología y ecología de la especie estudiada, sin embargo, independientemente del diseño, debe cumplir con ciertos requerimientos.

En el desarrollo de feromonas comerciales, todos los bioensayos deben demostrar atracción intraespecífica de forma consistente y reproducible. Según la especie, también es importante que se puedan diferenciar los comportamientos relacionados con dicha atracción y con el comportamiento sexual, por ejemplo, la activación (un comportamiento característico cuando un insecto percibe la feromona por primera vez), los patrones de locomoción particulares y los comportamientos de cortejo. Además, estos bioensayos deben asegurar que los insectos respondan a señales químicas liberadas por conespecíficos y no a otros estímulos (visuales, táctiles, auditivos, etc.). Normalmente, esto se logra mediante el aislamiento de los insectos que están liberando la feromona detrás de una malla o rejilla de poro lo suficientemente gruesa (~ 1 mm) que permita el flujo de aire sin crear turbulencia.

Finalmente, el sistema debe estar libre de contaminantes volátiles (olores ambientales) que puedan influenciar el comportamiento de los insectos, lo cual se logra con filtros de carbón activado para purificar el aire utilizado en los bioensayos.

Dos de los métodos de bioensayo más comunes en el estudio de feromonas son los olfatómetros en Y (*Y-tube* o *Y-maze*, en inglés) y los túneles de viento. El principio de ambos es el mismo. Ambos son sistemas cerrados con una corriente de aire controlada y continua que arrastra olores hacia el insecto que se está evaluando. El olfatómetro en Y está diseñado para evaluar insectos que caminan y, por su forma, permite evaluar la preferencia de un insecto hacia uno de dos olores (aunque, cuando se evalúan feromonas, normalmente se evalúa la feromona contra aire puro) (figura 15.2A). Los túneles de viento, por su parte, suelen ser más grandes, ya que se utilizan en ensayos con insectos voladores, que requieren de más espacio para moverse (figura 15.2B). Cabe resaltar que, en ensayos con insectos voladores muy pequeños, se han utilizado olfatómetros en Y. También existen diferentes tipos de olfatómetros (cuadrados, de cuatro brazos, etc.), los cuales suelen ser diseñados por los investigadores para responder a preguntas concretas o para trabajar con un tipo de insecto en particular (Howse, Stevens, & Jones, 2013).

La selección del bioensayo apropiado para una investigación depende del insecto que se quiera estudiar. Algunos de los factores importantes que se deben tener en cuenta al diseñar el bioensayo son las condiciones ambientales, el comportamiento de llamado del insecto (liberación de feromona), el comportamiento de respuesta de individuos conespecíficos, el periodo de actividad, el estado de madurez y fisiológico de los insectos, y las condiciones físicas en las cuales los insectos llevan a cabo el comportamiento.

Las condiciones ambientales —principalmente, la humedad relativa (Royer & McNeil, 1993; Webster & Cardé, 1982), la intensidad lumínica, la temperatura (Cardé & Roelofs, 1973; Schal & Cardé, 1986) y la presión atmosférica (para los insectos voladores) (Marchand & McNeil, 2000; Pellegrino et al., 2013)— son sumamente importantes, ya que si estas se salen de los rangos apropiados para la especie, se incrementa la variabilidad o se puede inhibir por completo el comportamiento de llamado o la respuesta a la feromona. De manera similar, cada especie tiene un periodo de llamado propio. Algunas de ellas liberan feromonas a lo largo de todo su periodo activo, mientras que otras solo las liberan durante cortos periodos del día o de la noche (Fatzinger, 1973; Hammack, 1995; Landolt & Sivinski, 1992). Fuera de estos periodos, es poco probable que los insectos receptores respondan a la feromona de forma adecuada, aunque la haya en el ambiente.

Del mismo modo, cada especie llega a la madurez sexual en diferente momento. Si los individuos son muy jóvenes o viejos, la producción de feromona puede ser muy baja o su composición puede estar errada (Shorey, McFarland, & Gaston, 1968; Spurgeon,

2003). Por otra parte, el sistema olfativo de los insectos puede estar subdesarrollado en adultos jóvenes o deteriorado en adultos viejos (Boughton & Fadamiro, 1996; Haniotakis & Pittara, 1994; Ó'Ceallacháin & Ryan, 1977). Finalmente, el estado fisiológico de los insectos es importante, por ejemplo, la hidratación es fundamental para el comportamiento adecuado de estos, mientras que la alimentación puede ser menos importante, dado que muchos de ellos no necesitan alimentarse en estado adulto (Landolt & Sivinski, 1992; Lebreton et al., 2015; Saveer et al., 2012).

Aislamiento de feromonas

Luego de tener un bioensayo fiable, es necesario aislar la feromona para su posterior análisis químico. Existen muchos métodos para aislar las feromonas volátiles, que se aplican según el tipo de insecto y de las capacidades de análisis químico que se tengan disponibles. Los insectos producen feromonas en cantidades sumamente bajas (nanogramos/min o inclusive picogramos/min), por lo que es necesario que el método utilizado logre capturar una cantidad suficiente de los compuestos para que estos puedan ser detectados. Además, el método de extracción de la feromona debe tratar de reducir los contaminantes, ya sean ambientales o provenientes del insecto.

Cuando se identificó la feromona del gusano de la seda (*Bombyx mori*), esta se extrajo directamente —mediante capilaridad— de las glándulas de medio millón de hembras (Butenandt et al., 1959). Hoy en día, la extracción de feromonas directamente de las glándulas que las producen sigue siendo el método más utilizado en polillas, ya que la glándula es conspicua

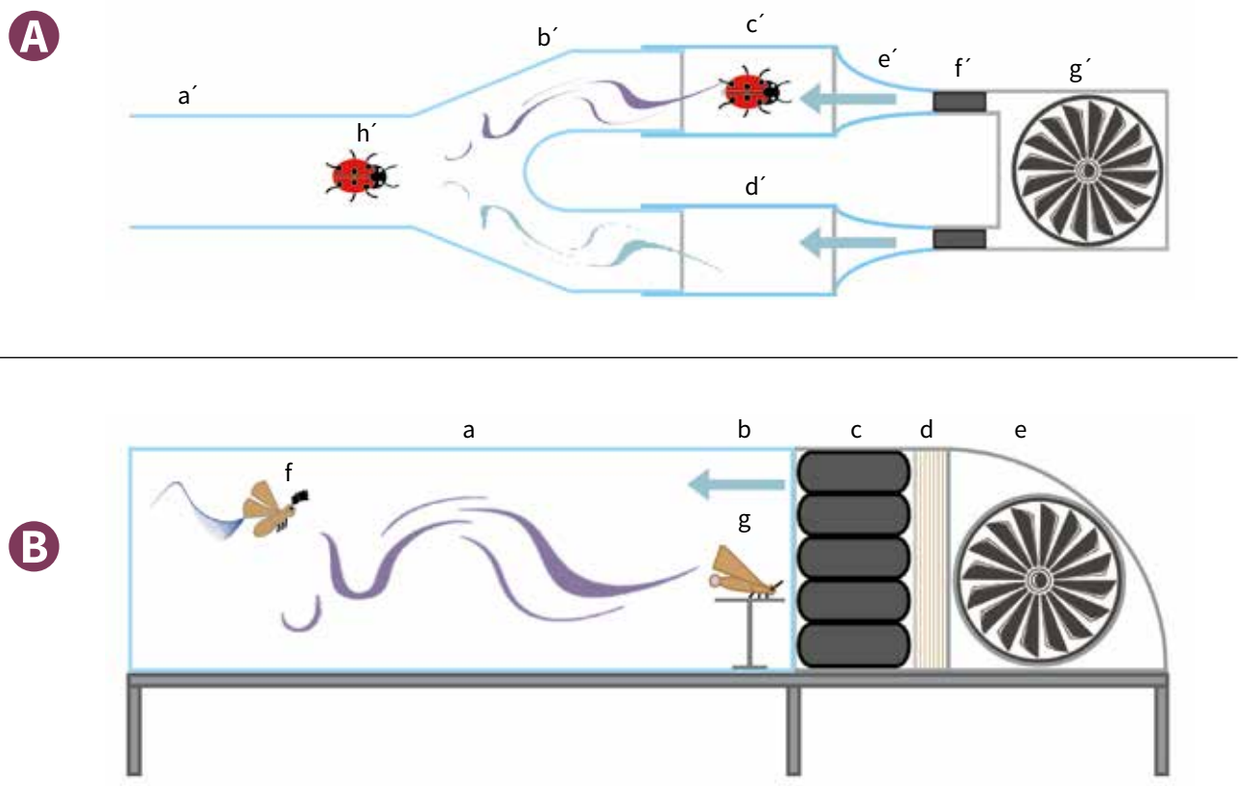


Figura 15.2. Ejemplos de bioensayos utilizados en el estudio de feromonas. A. Olfatómetro en Y: a´. Base en vidrio; b´. Bifurcación; c´. Cámara con fuente de feromona; d´. Cámara control; e´. Dirección del viento; f´. Filtro de carbón activado; g´. Ventilador o fuente de viento; h´. Insecto que responde al estímulo. B. Túnel de viento: a. Cámara de vuelo de vidrio o acrílico; b. Dirección del viento; c. Filtros de carbono activado; d. Filtro de aire de partículas gruesas; e. Ventilador graduable; f. Insecto que responde al estímulo; g. Fuente de feromona.

Fuente: Elaboración propia

y de fácil acceso, aunque ya no se hace mediante capilaridad. Actualmente, las glándulas de las polillas (o de otros insectos) se diseccionan, y la feromona se extrae en un solvente orgánico (normalmente hexano o diclorometano). De esta forma, y gracias a mejores métodos de análisis químico, el número de individuos necesarios se puede reducir a decenas o inclusive a insectos individuales (Bjostad, Gaston, & Shorey, 1980; Saveer et al., 2014). Aislar feromonas directamente de las glándulas permite extraer grandes cantidades de la sustancia y, al mismo tiempo, reducir la cantidad de contaminantes provenientes del insec-to. Sin embargo, este método es destructivo y no funciona para muchos tipos de insectos que no tienen glándulas de feromonas de fácil acceso o cuyo lugar de producción no se conoce (figura 15.3A).

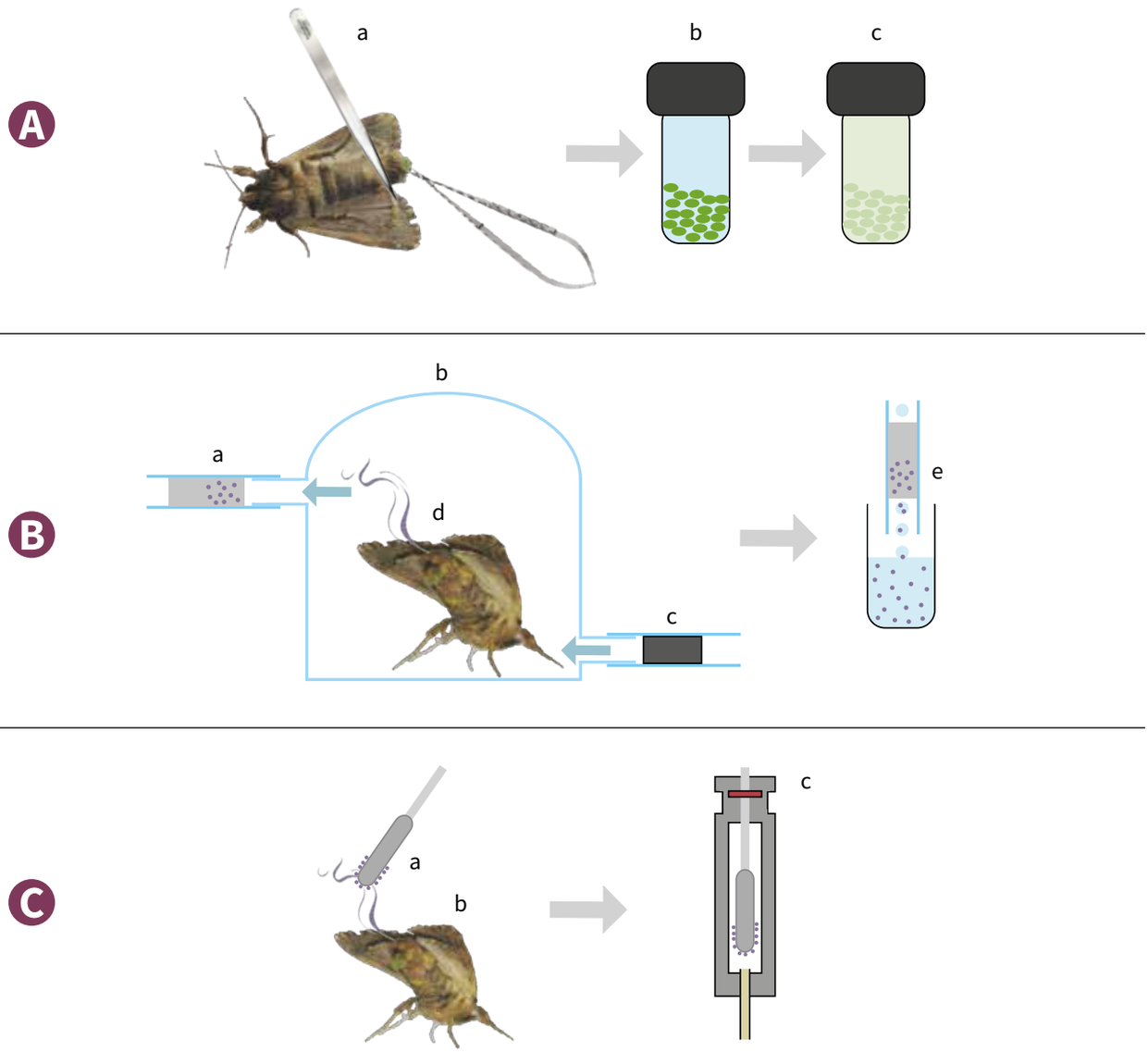


Figura 15.3. Métodos de extracción o aislamiento de feromonas. A. Disección de glándulas y extracción por solventes: a. Disección de la glándula de feromonas; b. Las feromonas son trasladadas a un vial con solvente orgánico; c. El solvente extrae el contenido y la feromona queda en solución para uso en bioensayos o análisis. B. *Dynamic headspace extraction*: a. Trampa de volátiles con matriz adsorbente; b. Recipiente sellado de vidrio; c. Filtro de carbón activado; d. insecto liberando la feromona; e. Extracción de los compuestos de la feromona por lavados de la trampa con solventes para obtener la feromona en solución. C. Aislamiento de feromona mediante SPME: a. Fibra adsorbente de microextracción por fase sólida; b. Insecto liberando feromona; c. La fibra es inyectada directamente en un cromatógrafo de gases para el análisis de la feromona.

Fuente: Elaboración propia

En el caso de estos últimos, se aplican otros métodos. Uno de ellos es el lavado de los insectos completos en solventes orgánicos. Aunque este método puede extraer la feromona, también va a extraer una gran cantidad de contaminantes, principalmente, ácidos grasos e hidrocarburos cuticulares. Este método puede ser útil para extraer feromonas no volátiles, pero no es recomendado para los compuestos volátiles. Para estos últimos se dispone hoy en día de dos métodos muy comunes para aislar las feromonas directamente del aire.

El primero de ellos es la "extracción dinámica de espacio de cabeza" (*dynamic headspace extraction*, DHE), que consiste en aislar los insectos en un ambiente hermético y hacer circular aire (previamente purificado con un filtro de carbón activado) dentro del recipiente. Este aire es forzado a salir a través de una trampa de volátiles que consiste en una matriz porosa adsorbente como TENAX, Super-Q (hoy en día descontinuado) o Porapak-Q. Los volátiles adsorbidos por estas trampas posteriormente se eluyen, utilizando un solvente orgánico. Al igual que los extractos glandulares, los volátiles se pueden conservar para su análisis posterior o su uso en bio-ensayos, lo cual no es posible con otros métodos (Blight, 1990; Rodríguez, Paliza, & Nazareno, 2017).

Esta es una de las grandes ventajas de dichas trampas, ya que idealmente siempre se debería verificar que la feromona aislada tenga el mismo efecto que aquella producida por los insectos. Sin esta verificación, es imposible estar seguros de que se aislaron todos los compuestos de la feromona, lo que puede llevar a un análisis incorrecto, con la consecuente pérdida de tiempo y de recursos.

Entre las principales desventajas de este método están las siguientes: normalmente se requieren muchos insectos para colectar cantidades suficientes de las feromonas, el sistema de extracción es engorroso, se requiere de electricidad —lo que resulta poco práctico en condiciones de campo— y de tiempos de muestreo de varias horas (Blight, 1990; Jones & Oldham, 1999) (figura 15.3B).

Para solucionar los inconvenientes logísticos del uso de DHE, se pueden utilizar microextractores en fase sólida (*solid-phase microextraction*, SPME). Las fibras de SPME fueron desarrolladas por Arthur Pawliszyn y consisten en fibras de dióxido de silicio (sílica) recubiertas con una capa delgada de un polímero absorbente líquido como el polidimetilsiloxano (PDMS) o de un adsorbente sólido (Pawliszyn, Pawliszyn, & Pawliszyn, 1997). Estas fibras colectan moléculas en el aire de forma pasiva, es decir, dependen de la difusión de las partículas en el aire. Por esta razón, la cantidad de moléculas que colectan es muy baja: normalmente se requiere de tiempos de colecta de varias horas o hasta de días enteros. Sin embargo, tales fibras se han utilizado exitosamente para colectar y aislar feromonas de muchos insectos, bien de insectos individuales —colocando la fibra cerca de la glándula de feromona—, bien de grupos de insectos —aislándolos para aumentar la cantidad de feromona en el aire— (Borg-Karlsona & Mozuraitis, 1996; Malosse, Ramirez-Lucas, Rochat, & Morin, 1995; Wang, Geertsema, Van Nieukerken, & Löfstedt, 2015).

Como alternativa, varios estudios han usado las fibras de SPME de forma directa —frotando las glándulas expuestas con la fibra— y han obtenido resultados similares a aquellos que se obtienen mediante la extracción con solventes (Gago et al., 2013; Millar et al., 2010). Sin embargo, una de las dificultades más grandes de este método es la fragilidad de las fibras, pues el contacto directo puede dañar su recubrimiento o la fibra misma.

Otros problemas de este método son, por un lado, su alto costo —las fibras cuestan cerca de US$300 cada una (aunque pueden reutilizarse)— y, por otro, que, una vez utilizadas, se debe analizar la muestra lo más pronto posible para evitar su contaminación (Pawliszyn et al., 1997) (figura 15.3C). Una alternativa reciente para reducir el costo del uso de las fibras de SPME —en especial, para uso directo— es la utilización de fibras ópticas desechables recubiertas con PDMS. A estas se les hace una extracción por solventes después de ser utilizadas, con lo cual se llega a resultados similares a los de los métodos de extracción directa de las glándulas y a aquellos en los que se usa DHE (Dynamic Headspace Extraction). Estas fibras desechables permiten hacer extracciones rápidas a una gran cantidad de individuos, a bajo costo (Lievers & Groot, 2016).

Caracterización y síntesis de feromonas

La caracterización de las feromonas requiere que los compuestos individuales de la muestra aislada sean separados para su posterior identificación. Cuando se inició el estudio de las feromonas de los insectos, se utilizaron métodos como la destilación, para separar los compuestos más volátiles de los ácidos grasos más pesados, y la cromatografía de capa fina, para separar los diferentes compuestos gracias a diferencias en su polaridad (Carlson et al., 1972). Las bandas generadas en las placas se extraían utilizando solventes para su posterior identificación. Desde mediados de los años sesenta, se comenzó a utilizar la cromatografía de gases (GC, por su sigla en inglés) para separar los compuestos y obtener el tiempo de retención y la cantidad relativa de cada uno mediante un detector de ionización de llama (FID, por su sigla en inglés). La desventaja de la GC es que es un método destructivo, es decir, la muestra no se puede recuperar y reutilizar. Sin embargo, su gran sensibilidad, rapidez y versatilidad (dado que se pueden utilizar columnas diferentes para separar compuestos de diferentes tipos, como isómeros E/Z y R/S) han llevado a que sea el método estándar hoy en día (Blight, 1990; Howse et al., 2013; Lanucara, Holman, Gray, & Eyers, 2014).

La identificación de los compuestos se puede llevar a cabo mediante métodos químicos y físicos. El método o métodos utilizados depende de la complejidad y la naturaleza del compuesto de interés. Dentro de los métodos físicos, el más común, gracias a su sensibilidad, es la espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases (GC-MS, por sus siglas en inglés). La espectrometría de masas da información sobre el peso molecular, la composición elemental de la molécula y su estructura. Este método rompe las moléculas a través de impactos con electrones para formar un patrón de cationes (el espectrómetro), cada uno con una relación de masa/carga eléctrica (m/z) específica. Una vez obtenidos, los espectrómetros pueden ser analizados por un experto o comparados con librerías de espectrómetros —la del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, por su sigla en inglés) es la más común— (Blight, 1990). En esta comparación se tiene la probabilidad de que el espectrómetro obtenido sea igual al de compuestos conocidos, sin embargo, aunque esta probabilidad sea alta, se debería llevar a cabo una verificación en la que se compare el espectro obtenido de la muestra con el espectro obtenido de un estándar sintético del compuesto.

Otros métodos incluyen la espectroscopia infrarroja (IR), la espectrometría ultravioleta-visible (UV-Vis), la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR) y la comparación de índices de retención de Kováts. La espectroscopia infrarroja es un buen método para determinar el "esqueleto" (la estructura general de la cadena de carbonos de la molécula) y potencialmente (dependiendo sobre cuál carbono estén localizados) algunos grupos funcionales. Aunque actualmente existen espectrómetros infrarrojos acoplados a cromatógrafos de gases, la mayoría de estos equipos todavía requiere de muestras puras. La espectrometría UV-Vis sirve para determinar si un compuesto tiene o no un sistema conjugado y puede ayudar a determinar el tipo de conjugación (Howse et al., 2013). La NMR es un método no destructivo que permite determinar grupos funcionales, estructura 3D y, en algunos casos, la estereoisometría. Sin embargo, requiere cantidades relativamente grandes de muestra purificada, y los espectros de moléculas grandes (en este caso feromonas no volátiles) pueden ser difíciles de interpretar (Lanucara et al., 2014).

Por último, el uso de índices de retención de Kováts puede dar información acerca del tamaño molecular, la polaridad y los grupos funcionales asociados de una molécula. Este método se basa en determinar el tiempo en el que se eluye un compuesto en un cromatógrafo de gases, en relación con los tiempos en los que se eluyen los diferentes n-alcanos. El índice de Kováts estandariza estos valores para que sean relativamente independientes de las condiciones experimentales y puedan ser comparados con listas de índices reportados para llegar a una aproximación de la identidad de un compuesto (Kováts, 1958).

Los métodos químicos suelen estar ligados al uso de GC-MS, ya que se basan en la comparación del espectrograma original con aquel que se genera luego de que la molécula sea alterada por una reacción química. A continuación, se mencionan algunas de

las reacciones más importantes en la determinación de estructura de las feromonas de los insectos: la hidrogenación catalítica rompe los enlaces dobles y triples entre átomos de carbono o en anillos epoxídicos; la ruptura de cada enlace doble agrega dos átomos de hidrógeno, lo cual incrementa el peso molecular en dos, esto permite determinar el número de estos enlaces (Navarro & Navarro, 2004); de forma similar, las reducciones con hidruros metálicos reducen, a su vez, los enlaces dobles entre átomos de carbono y átomos de oxígeno, lo que reduce aldehídos, cetonas, esteres y ácidos orgánicos a alcoholes (Gaylord, 1957). Además, existen procesos oxidativos que pueden ayudar a determinar la posición de enlaces dobles o grupos funcionales.

La ozonólisis, por su parte, rompe la cadena de carbono donde hay enlaces dobles entre átomos de carbono y genera aldehídos y cetonas en la posición en la que se encontraban estos enlaces. Así, dos (o más) moléculas resultantes suelen ser más fáciles de identificar y, a partir de estas, se puede reconstruir la molécula original (Schwartz, Raible, Mott, & Dussault, 2006). La oxidación mediante cromio (VI) afecta únicamente alcoholes primarios, secundarios y aldehídos, sin oxidar cetonas, enlaces entre carbonos o anillos aromáticos (Howse et al., 2013). Aunque existen muchos otros métodos para la identificación de compuestos de feromonas, estos son los relevantes para el objetivo de este libro. La síntesis química y biosíntesis por parte de los insectos de las feromonas es un tema complejo y específico de cada compuesto (véase Blomquist & Vogt, 2003; Jurenka, 2004; Prestwich & Blomquist, 2014). En cualquier caso, es necesario resaltar que la síntesis de feromonas a baja escala es normalmente un proceso costoso y que requiere de un escalamiento para que estas puedan ser llevadas al mercado.

En contraste, la síntesis de feromonas por parte de los insectos se lleva a cabo principalmente por reacciones enzimáticas, a partir de precursores comunes. En las polillas, por ejemplo, la mayoría de los compuestos de sus feromonas se sintetizan a partir de ácidos grasos saturados, como el ácido palmítico (16 carbonos) o sus precursores. Este precursor puede ser alargado mediante la adición de dos carbonos al extremo terminal (Zabin, 1951) o acortado mediante oxidación beta (Löfstedt & Bengtsson, 1988), para formar ácidos grasos precursores de diferentes longitudes. Estos ácidos grasos saturados luego son convertidos en ácidos grasos mono o poliinsaturados mediante la actividad de Δ desaturasas (Liénard et al., 2008; Liénard et al., 2014; Löfstedt & Bengtsson, 1988). La biosíntesis de feromonas es un tema extenso y que varía mucho en los diferentes órdenes de insectos. Para más información sobre la biosíntesis de las feromonas en otros grupos de insectos, se recomienda el trabajo de Jurenka (2004).

Una vez sintetizada una feromona, es importante volver al bioensayo estandarizado para verificar que los compuestos puros, sintetizados, tengan la misma actividad que los compuestos originalmente aislados. Una de las dificultades de este proceso es que muchas de las feromonas de los insectos no son un solo compuesto, sino una mezcla de varios en proporciones específicas (Andersson et al., 2009; Bartelt et al., 2009; Batista-Pereira et al., 2006; Bengtsson et al., 2014; Gries et al., 2015). El resultado obtenido por cromatografía de gases da las cantidades relativas de los compuestos en la muestra, es decir, permite conocer su proporción. Sin embargo, que un compuesto se encuentre en la muestra no significa que sea parte de la feromona. En 1957, Schneider y Kaissling (1957) desarrollaron la electroantenografía (EAG) para solucionar este problema. La electroantenografía consiste en conectar la antena de un insecto, su principal órgano olfativo, a dos electrodos para medir los impulsos nerviosos que genera o no genera esta cuando es expuesta a un olor en particular. De esta forma, se puede saber si un insecto tiene la capacidad de detectar un compuesto o no. Hoy en día, es común que los equipos de EAG estén acoplados a cromatógrafos de gases (gas-chromatographic-electroantennogram detector, GC-EAD, por sus siglas en inglés), lo que permite determinar cuáles compuestos dentro de una muestra son percibidos por la antena y cuáles no (figura 15.4).

No obstante, el hecho de que una antena responda a un compuesto dentro de la mezcla no significa que el compuesto sea parte de la feromona del insecto. La antena puede estar respondiendo a contaminantes en la muestra, a precursores de la síntesis de un compuesto de la feromona o a otros compuestos que resultan de la síntesis de esta. Por ejemplo, el limoneno, compuesto responsable del olor a limón y a naranja, es percibido por varias especies de insectos (Alhmedi,

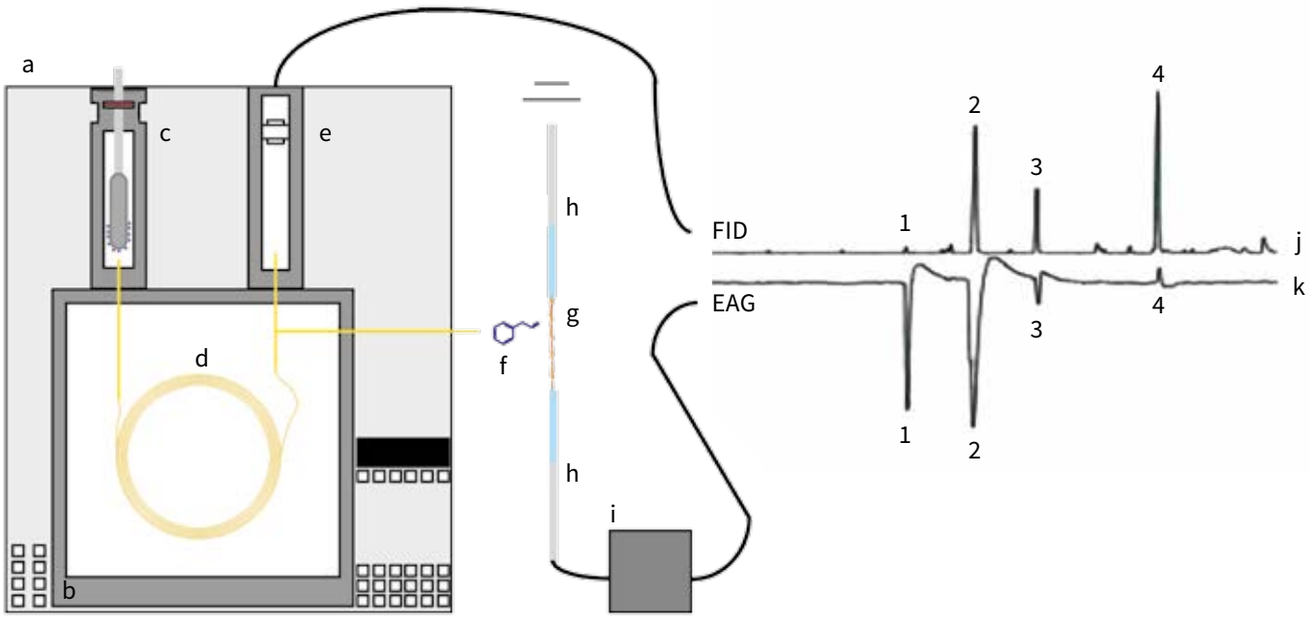


Figura 15.4. Cromatografía de gases acoplada a electroantenografía. a. Cromatógrafo de gases; b. Horno; c. Inyector; d. Columna de separación; e. Detector por ionización de llama (FID); f. Bifurcación que permite dividir los compuestos entre el FID y el electroantenógrafo; g. Antena del insecto de interés; h. Electrodos; i. Amplificador de señal IDAC; j. Trazo del FID que muestra cantidades relativas y el orden de elución de los compuestos en la muestra; k. Trazo del electroantenógrafo que muestra a cuáles compuestos responde la antena.

Fuente: Elaboración propia

Haubruge, & Francis, 2010; Borrero-Echeverry et al., 2015; Miller, 2007; Wei, Yang, Hao & Du, 2008). También es un compuesto que se encuentra en la mayoría de los detergentes y productos de limpieza, lo que lo convierte en un contaminante común en las muestras de laboratorio. Aunque el limoneno se ha encontrado en muestras de feromona de *Spodoptera littoralis* (como un contaminante), y esta polilla responde a él (Borrero-Echeverry et al., 2015), este no hace parte de la feromona de dicha especie (Saveer et al., 2014). Sin embargo, este compuesto sí hace parte de la feromona del coleóptero *Alphitobius diaperinus* (Bartelt et al., 2009). Es por esto que siempre se debe volver al bioensayo para asegurarse de que la mezcla determinada muestre una atracción similar a aquella producida por los insectos. De no ser así, la mezcla puede tener algún compuesto que no hace parte de ella, el cual puede inhibir la atracción de los insectos. Así mismo, a la mezcla le pueden faltar compuestos o las proporciones pueden estar equivocadas (si se asume que los compuestos fueron identificados correctamente). Una vez se ha determinado cuál es la composición correcta de la feromona y los compuestos se han sintetizado, se puede pasar a la formulación de esta.

Formulación

La formulación de las feromonas depende principalmente de su función. Las formulaciones para monitoreo, captura masiva y estrategias de *lure and kill* ('atraer y matar') suelen ser más simples que aquellas usadas en estrategias de interrupción de la cópula. Sea cual fuere el uso que se le vaya a dar a la feromona, se deben tener en cuenta varios factores tanto técnicos como de mercado para su formulación.

La principal consideración técnica que se debe tener en cuenta en el proceso de formular una feromona es la mezcla que se va a utilizar. La mayoría de las formulaciones de feromonas consisten en diferentes sistemas que permiten que la feromona sea liberada lentamente a lo largo del tiempo (membranas, resinas, ceras). La consideración más importante en la formulación de feromonas es la tasa de liberación de los diferentes compuestos dentro de la mezcla. Dado que cada compuesto tiene una volatilidad diferente, relacionada directamente con el tipo de formulación, estos no necesariamente se pueden formular en la misma proporción en que fueron detectadas en las glándulas de los insectos o a través de DHE. Para lograr esto, hay que verificar la emisión de la feromona por el dispensador y modificar el contenido de cada compuesto respectivamente.

El segundo aspecto técnico que se debe tener en cuenta es la degradación de los compuestos en el dispensador. La formulación de los dispensadores debe proteger los compuestos de factores ambientales como la luz UV, la oxidación y la lluvia. Muchos compuestos que hacen parte de las feromonas de los insectos pueden ser degradados por la radiación UV o por la oxidación. Del mismo modo, muchos compuestos con isómeros no son estables y tienden a llegar a un equilibrio entre ellos (E/Z o R/S). En los dispensadores, esto debe tenerse en cuenta, de modo que se intente reducir al máximo los efectos de la radiación UV o de la oxidación en la feromona que contienen (Brown & McDonough, 1986; Cork et al., 2008; Môttus et al., 1997). También es necesario que los dispensadores ofrezcan alguna protección contra la lluvia, para que las feromonas tengan una mayor vida útil (Knight et al., 2004). Finalmente, se debe considerar la cantidad de feromona que se dosifica en el dispensador, de lo cual depende la vida útil de este.

La duración del dispensador en campo también es importante para el mercadeo de las feromonas, ya que, dependiendo de su propósito, puede ser necesario que las formulaciones duren un ciclo de cultivo entero o una fracción específica de este según la dinámica de la plaga en el sistema productivo. Una dosis más alta que la requerida significa un gasto innecesario, y una dosis muy baja, que no logre cubrir el tiempo deseado, significaría que los agricultores o agencias de control tendrían que comprar más dispensadores, lo cual eleva los costos de esta tecnología y la hace potencialmente menos atractiva en el mercado.

También se debe tener en cuenta la sostenibilidad del producto. Hoy en día, el mercado está cambiando radicalmente hacia el uso de productos más amigables con el medioambiente. Los desechos plásticos cada vez son menos deseables, lo cual ha hecho que el desarrollo de los dispensadores de feromonas esté cambiando el uso de membranas y dispensadores plásticos por el de dispensadores biodegradables (Lance et al., 2016). Sakurada y Suzuki (2002) han patentado dispensadores genéricos biodegradables a partir de poliésteres alifáticos. Rama et al. (2011) han desarrollado dispensadores para el control de *Spodoptera littoralis* a base de celulosa y biopolímeros con buenos resultados. Hellmann et al. (2011) han desarrollado nanofibras a base de celulosa como dispensadores biodegradables, y varios grupos han trabajado con parafinas para solucionar este problema (Atterholt et al., 1999; De Lame et al., 2007).

Si bien existen varios métodos para utilizar las feromonas en el control de plagas, estos se pueden dividir, a grandes rasgos, en métodos de inundación (interrupción de la cópula) y métodos de captura (monitoreo, capturas masivas, *lure and kill*) (en el capítulo 8 de este libro, "Las feromonas en el control de insectos", se amplían estos temas). La gran diferencia entre las dos estrategias es la cantidad de feromona que se utiliza en cada una. Las estrategias de inundación se basan en saturar el ambiente de un cultivo con feromona, lo cual requiere una cantidad muy grande de esta, mientras que las estrategias de captura utilizan puntos de liberación discretos y, por ende, cantidades menores de feromona. Estos requerimientos han sido, en consecuencia, los responsables del desarrollo y diversificación de las formulaciones de feromonas.

Para monitoreo y captura masiva, normalmente se utilizan tapones de caucho cargados de feromona o dispensadores de plástico semipermeables (figura 15.5a). La primera de estas formulaciones tiene la ventaja de ser de bajo costo. Sin embargo, por lo general, tiene una duración baja (uno o dos meses, según la carga original y la temperatura) y es susceptible a cambios en las proporciones de los

compuestos (Brown & McDonough, 1986; Môttus et al., 1997). En contraste, los dispensadores plásticos semipermeables pueden tener una cantidad mucho mayor de feromona, lo que hace que funcionen varios meses y a mayor distancia, además, le brindan mayor estabilidad a los compuestos (figuras 15.5b y 15.5c) (Baker et al., 2016).

La mayor variedad de dispensadores de feromona ha sido desarrollada para estrategias de inundación. Las estrategias de manejo que acuden a la interrupción de la cópula se utilizan, por lo general, en grandes áreas o a escala regional (Witzgall et al., 2010), lo cual implica grandes cantidades de feromona. Este problema se puede afrontar de dos formas. La primera es utilizar un número menor de dispensadores que liberen cantidades mayores de feromona (megadispensadores o mesodispensadores) y la segunda es utilizar un gran número de dispensadores pequeños más ampliamente distribuidos. Ambos métodos han sido utilizados con éxito en diferentes sistemas productivos (Light, Grant, Haff, & Knight, 2017; McGhee, Gut, & Miller, 2014). La decisión sobre el tipo de dispensador dependerá, sobre todo, del área que se va a tratar y de otros costos asociados, como la mano de obra requerida (Miller & Gut, 2015).

Los megadispensadores se utilizan en concentraciones de solo unas pocas unidades: 2 o 3 por hectárea. Los dispensadores MSTRS (*metered semiochemical timed release system*) liberan grandes cantidades de feromona (miligramos) en aerosol de forma automática cada cierta cantidad de tiempo (10-20 minutos), únicamente durante el periodo activo del insecto al que se quiere afectar (Baker et al., 2016; Shorey & Gerber, 1996b). Aunque estos dispensadores se han utilizado en varios sistemas (Baker et al., 1997; Shorey & Gerber, 1996a; 1996b), su alto costo (de equipos y de feromona) y los problemas con la dispersión homogénea de la feromona en el área designada (por dinámicas climáticas) han llevado a que se prefiera el uso de mesodispensadores (Baker et al., 2016). Estos últimos (± 20 dispensadores por hectárea) tienen una mejor cobertura de área y, aunque pueden ser MRTRS que liberen cantidades menores, también pueden ser dispensadores plásticos similares a los utilizados para monitoreo y capturas, que tienen mayor carga de feromona y una mayor tasa de liberación (Baker et al., 2016; Miller & Gut, 2015).

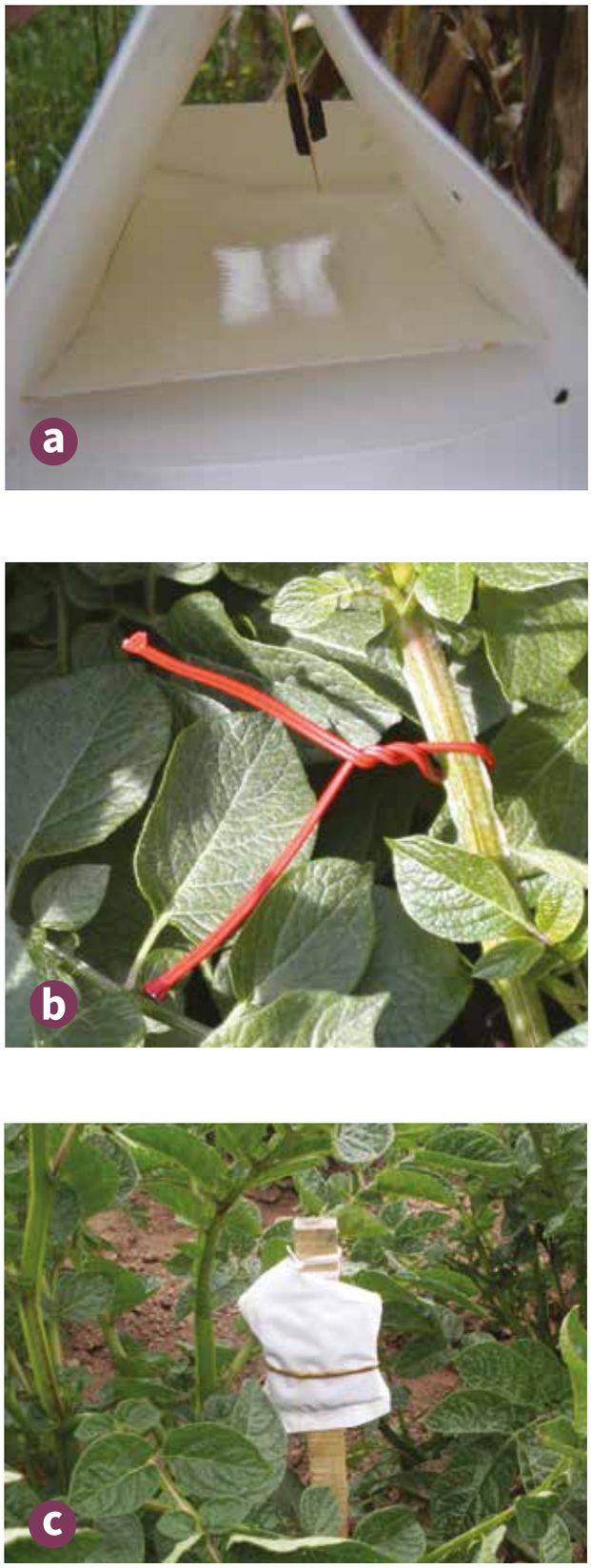


Figura 15.5. Ejemplos de feromonas formuladas. a. Tapones de caucho en una trampa pegajosa delta; b. Dispensador tipo "Rope" de Shin-Etsu Chemical; c. Dispensador de membrana semipermeable tipo "Baggie" de ChemTica International.

Las estrategias posibles si se usa un gran número de dispensadores (entre cien y millones de dispensadores por hectárea) son bastante variadas y se cuentan entre las más exitosas (Lance et al., 2016; Witzgall et al., 2010). Los dispensadores de aplicación manual (entre 100 y 1.000 por hectárea) son semejantes a aquellos que se usan para el monitoreo y captura: son de plástico o de polímeros sintéticos que emiten feromonas (varios µg/hora) durante varios meses (normalmente entre dos y seis). A pesar de su éxito, los altos costos de mano de obra en los países donde más se utilizan (Estados Unidos y varios países de Europa) han llevado a que se desarrollen formulaciones que se puedan aplicar con maquinaria.

Una de las soluciones, en este sentido, ha sido la microencapsulación de feromona en diferentes polímeros, como el alginato (Hall et al., 1982; Heuskin, Lorge, et al., 2011; Heuskin, Verheggen, Haubruge, Wathelet, & Lognay, 2011). Las feromonas microencapsuladas normalmente tienen diámetros cercanos a 30 µm (lo cual permite que se apliquen con equipos convencionales) y se utilizan en densidades de más de un millón de partículas por hectárea, que en conjunto liberan hasta 100 g de feromona y tienen una duración en campo de cerca de un mes (Hall et al., 1982; Miller & Gut, 2015). Aunque las feromonas microencapsuladas han funcionado en algunos casos, como el de la polilla oriental de las frutas (Il'Ichev et al., 2006), los resultados han sido poco consistentes. Además, por su corta duración, se requieren varias aplicaciones a lo largo de la temporada de cultivo.

Para el manejo de insectos en áreas aún más grandes (cientos de miles de hectáreas), como es el caso de la polilla gitana (*Lymantria dispar*) en los Estados Unidos, se han desarrollado formulaciones que se pueden aplicar con maquinaria de fumigación o desde el aire, como emulsiones de parafina (Atterholt et al., 1999; Onufrieva et al., 2010; Stelinski et al., 2005), nanofibras huecas de resinas poliacetiladas (Gaston et al., 1977) y escamas plásticas laminadas (hoy en día, formuladas con base en polímeros biodegradables) (Kydonieus & Beroza, 1981). La gran desventaja de estas formulaciones es su baja persistencia en el ambiente y baja adherencia al follaje, así como su deterioro por la lluvia. Aunque estas desventajas se pueden solucionar parcialmente con aditivos (adherentes y protectantes), siguen siendo obstáculo para su inserción en el mercado (Miller & Gut, 2015).

Una alternativa para los futuros desarrollos en feromonas es el uso de ingeniería genética para crear plantas que sinteticen estos compuestos de forma constitutiva. Esto permitiría proteger los cultivos de forma sostenible, ya que no sería necesaria la producción y aplicación de dispensadores. En 2015 se desarrolló la primera variedad transgénica de trigo que sintetiza la feromona de alarma de varias especies de áfidos: el (E)-ß-farneceno (Bruce et al., 2015). Aunque en el laboratorio se observó un buen efecto de control mediante la repelencia de áfidos y la atracción de parasitoides, estos resultados no pudieron validarse en campo, posiblemente debido a una baja población de áfidos en campo durante el año en el que se llevó a cabo la evaluación.

Validación

Como se ha dicho antes, el efecto de toda feromona formulada debe ser validado tanto en laboratorio como en campo. Lo más importante es verificar que la feromona liberada por el dispensador sea igual de activa que la feromona producida por los insectos. También se debe evaluar la duración de los dispensadores, para tener una aproximación de su vida útil tanto en almacenamiento como en campo. Finalmente, se debe evaluar la proporción en la que se liberan los diferentes compuestos a lo largo del tiempo, ya que esta puede cambiar y se puede perder la eficacia de la feromona. Estas validaciones se deben llevar a cabo a lo largo del tiempo, en diferentes lotes de producción y diferentes tiempos de almacenamiento (Mayer & Mitchell, 1998).

Una vez validada la formulación en condiciones controladas, se deben realizar evaluaciones en campo para determinar cómo las condiciones climáticas afectan la vida útil de los dispensadores. Además, es necesario verificar que la feromona, en combinación con otras sustancias volátiles ambientales, esté funcionando de forma adecuada. Existen interacciones con los volátiles producidos por las plantas o con la polución que ocasionan modificaciones en el comportamiento de los insectos. Estas interacciones usualmente no se evidencian en el laboratorio (Borrero-Echeverry, 2016; Hatano et al., 2015; Party et al., 2013; Pregitzer et al., 2012). Además, se ha visto que las feromonas pueden variar en su composición entre diferentes poblaciones de la misma especie, lo cual significa que una feromona estudiada, formulada y verificada en una localidad puede no funcionar en otra (Batista-Pereira et al., 2006; Bengtsson et al., 2014; Unbehend et al., 2013). Por lo tanto, es necesario hacer una evaluación constante de estas para prevenir o corregir oportunamente sus deficiencias.

Agradecimientos

El autor agradece a los revisores y editores por sus contribuciones a este capítulo, y a Alba Marina Cotes por la invitación a participar como autor de este libro.

Referencias

Alhmedi, A., Haubruge, E., & Francis, F. (2010). Identification of limonene as a potential kairomone of the harlequin ladybird *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *European Journal of Entomology*, *107*(4), 541-548.

Andersson, M. N., Haftmann, J., Stuart, J. J., Cambron, S. E., Harris, M. O., Foster, S. P., ... Hillbur, Y. (2009). Identification of sex cheromone components of the Hessian fly, *Mayetiola destructor*. *Journal of Chemical Ecology*, *35*(1), 81-95. doi:10.1007/s10886-008-9569-1.

Atterholt, C. A., Delwiche, M. J., Rice, R. E., & Krochta, J. M. (1999). Controlled release of insect sex pheromones from paraffin wax and emulsions. *Journal of Controlled Release*, *57*(3), 233-247. doi:10.1016/S0168-3659(98)00119-9.

Baker, T. C., Dittl, T., & Mafra-Neto, A. (1997). Disruption of sex pheromone communication in the blackheaded fireworm in Wisconsin cranberry marshes by using MSTRS devices. *Journal of Agricultural Entomology*, *14*(4), 449-457.

Baker, T. C., Myrick, A. J., & Park, K. C. (2016). Optimizing the point-source emission rates and geometries of pheromone mating disruption mega-dispensers. *Journal of Chemical Ecology*, *42*(9), 896-907. doi:10.1007/s10886-016-0769-9.

Bartelt, R. J., Zilkowski, B. W., Cossé, A. A., Steelman, C. D., & Singh, N. (2009). Male-produced aggregation pheromone of the Lesser Mealworm beetle, *Alphitobius diaperinus*. *Journal of Chemical Ecology*, *35*(4), 422-434. doi:10.1007/s10886-009-9611-y.

Batista-Pereira, L. G., Stein, K., De Paula, A. F., Moreira, J. A., Cruz, I., Figueiredo, M. D., ... Correa, A. G. (2006). Isolation, identification, synthesis, and field evaluation of the sex pheromone of the Brazilian population of *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Chemical Ecology*, *32*(5), 1085-1099. doi:10.1007/s10886-006-9048-5.

Bengtsson, M., Boutitie, A., Jósvai, J., Toth, M., Andreadis, S., Rauscher, S., ... Witzgall, P. (2014). Pheromone races of *Cydia splendana* (Lepidoptera, Tortricidae) overlap in host plant association and geographic distribution. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *2*, 46. doi:10.3389/fevo.2014.00046.

Bjostad, L. B., Gaston, L. K., & Shorey, H. H. (1980). Temporal pattern of sex pheromone release by female *Trichoplusia ni*. *Journal of Insect Physiology*, *26*(7), 493-498. doi:10.1016/0022-1910(80)90122-5.

Blight, M. M. (1990). Techniques for isolation and characterization of volatile semiochemicals of phytophagous insects. In A. R. McCaffery, & I. D. Wilson (Eds.), *Chromatography and isolation of insect hormones and pheromones* (pp. 281-288). Boston, EE. UU.: Springer.

Blomquist, G. J., & Vogt, R. G. (2003). *Insect pheromone biochemistry and molecular biology: The biosynthesis and detection of pheromones and plant volatiles*. San Diego, EE. UU.: Elsevier.

Borg-Karlsona, A.-K., & Mozuraitis, R. (1996). Solid phase micro extraction technique used for collecting semiochemicals. Identification of volatiles released by individual signalling *Phyllonorycter sylvella* moths. *Zeitschrift für Naturforschung C*, *51*(7-8), 599-602. doi:10.1515/znc-1996-7-820.

Borrero-Echeverry, F. (2016). *Social and environmental olfactory signals mediate insect behavioral ecology and evolution* (tesis doctoral). Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp, Sweden.

Borrero-Echeverry, F., Becher, P. G., Birgersson, G., Bengtsson, M., Witzgall, P., & Saveer, A. M. (2015). Flight attraction of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera, Noctuidae) to cotton headspace and synthetic volatile blends. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *3*, 56. doi:10.3389/fevo.2015.00056.

Boughton, A., & Fadamiro, H. Y. (1996). Effect of age and sex on the response of walking *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) to its male-produced aggregation pheromone. *Journal of Stored Products Research*, *32*(1), 13-20. doi:10.1016/0022-474x(95)00040-e.

Brown, D. F., & McDonough, L. M. (1986). Insect sex pheromones: Formulations to increase the stability of conjugated dienes. *Journal of Economic Entomology*, *79*(4), 922-927. doi:10.1093/jee/79.4.922.

Bruce, T. J. A., Aradottir, G. I., Smart, L. E., Martin, J. L., Caulfield, J. C., Doherty, A., ... Pickett, J. A. (2015). The first crop plant genetically engineered to

release an insect pheromone for defence. *Scientific Reports*, *5*, 11183. doi:10.1038/srep11183.

Butenandt, A., Beckmann, R., Stamm, D., & Hecker, E. (1959). Über den sexuallockstoff des seidenspinners *Bombyx mori*. Reindarstellung und konstitution. *Zeitschrift für Naturforschung B*, *14*, 283-284.

Cardé, R. T., & Roelofs, W. L. (1973). Temperature modification of male sex pheromone response and factors affecting female calling in *Holomelina immaculata* (Lepidoptera:Arctiidae). *The Canadian Entomologist*, *105*(12), 1505-1512. doi:10.4039/Ent1051505-12.

Carlson, D. A., Mayer, M. S., Silhacek, D. L., James, J. D., Beroza, M., & Bierl, B. A. (1971). Sex attractant pheromone of the house fly: isolation, identification and synthesis. *Science*, *174*(4004), 76-78.

Cork, A., De Souza, K., Hall, D. R., Jones, O. T., Casagrande, E., Krishnaiah, K., & Syed, Z. (2008). Development of PVC-resin-controlled release formulation for pheromones and use in mating disruption of yellow rice stem borer, *Scirpophaga incertulas*. *Crop Protection*, *27*(2), 248-255. doi:10.1016/j.cropro.2007.05.011.

De Lame, F. M., Miller, J. R., Atterholt, C. A., & Gut, L. J. (2007). Development and evaluation of an emulsified paraffin wax dispenser for season-long mating disruption of *Grapholita molesta* in commercial peach orchards. *Journal of Economic Entomology*, *100*(4), 1316-1327. doi:10.1603/0022-0493(2007)100[1316:DAEOAE]2.0.CO;2.

Fatzinger, C. W. (1973). Circadian rhythmicity of sex pheromone release by *Dioryctria abietella* (Lepidoptera: Pyralidae (Phycitinae)) and the effect of a diel light cycle on its precopulatory behavior. *Annals of the Entomological Society of America*, *66*(5), 1147-1153. doi:10.1093/aesa/66.5.1147.

Gago, R., Allison, J. D., McElfresh, J. S., Haynes, K. F., McKenney, J., Guerrero, A., & Millar, J. G. (2013). A tetraene aldehyde as the major sex pheromone component of the Promethea moth (*Callosamia promethea* (Drury)). *Journal of Chemical Ecology*, *39*(10), 1263-1272. doi:10.1007/s10886-013-0349-1.

Gaston, L. K., Kaae, R., Shorey, H., & Sellers, D. (1977). Controlling the pink bollworm by disrupting sex pheromone communication between adult moths. *Science*, *196*(4292), 904-905. doi:10.1126/science.870967

Gaylord, N. G. (1957). Reduction with complex metal hydrides. *Journal of Chemical Education*, *34*(8), 367. doi:10.1021/ed034p367.

Gries, R., Britton, R., Holmes, M., Zhai, H., Draper, J., & Gries, G. (2015). Bed bug aggregation pheromone finally identified. *Angewandte Chemie*, *54*(4), 1151-1154. doi:10.1002/anie.201409890.

Hall, D. R., Nesbitt, B. F., Marrs, G. J., Green, A. S. J., Campion, D. G., & Critchley, B. R. (1982). Development of microencapsulated pheromone formulations. In B. A. Leonhardt, & M. Beroza (Eds.), *Insect pheromone technology: Chemistry and applications* (pp. 131-143). Washington, EE. UU.: American Chemical Society.

Hammack, L. (1995). Calling behavior in female Western Corn Rootworm beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). *Annals of the Entomological Society of America*, *88*(4), 562-569. doi:10.1093/aesa/88.4.562.

Haniotakis, G. E., & Pittara, I. S. (1994). Response of *Bactrocera* (*Dacus*) *oleae* males (Diptera: Tephritidae) to pheromones as affected by concentration, insect age, time of day, and previous exposure. *Environmental entomology*, *23*(3), 726-731. doi:10.1093/ee/23.3.726.

Hatano, E., Saveer, A., Borrero-Echeverry, F., Strauch, M., Zakir, A., Bengtsson, M., ... Dekker, T. (2015). A herbivore-induced plant volatile interferes with host plant and mate location in moths through suppression of olfactory signaling pathways. *BMC Biology*, *13*, 75. doi:10.1186/s12915-015-0188-3.

Hellmann, C., Greiner, A., & Wendorff, J. H. (2011). Design of pheromone releasing nanofibers for plant protection. *Polymers for Advanced Technologies*, *22*(4), 407-413. doi:10.1002/pat.1532..0

Heuskin, S., Lorge, S., Godin, B., Leroy, P., Frere, I., Verheggen, F.J., ... Lognay, G. (2011a). Optimisation of a semiochemical slow-release alginate formulation attractive towards *Aphidius ervi* Haliday parasitoids. *Pest Management Science*, 68(1), 127-136. doi:10.1002/ps.2234.

Heuskin, S., Verheggen, F. J., Haubruge, E., Wathelet, J.-P., & Lognay, G. (2011b). The use of semiochemical slow-release devices in integrated pest management strategies. *Biotechnologie Agronomie Societe et Environnement*, *15*(3), 459-470.

Howse, P., Stevens, J., & Jones, O. T. (2013). *Insect pheromones and their use in pest management*. Dordrecht, Holanda: Springer Science & Business Media.

Il'Ichev, A. L., Stelinski, L. L., Williams, D. G., & Gut, L. J. (2006). Sprayable microencapsulated sex pheromone formulation for mating disruption of oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) in Australian peach and pear orchards. *Journal of Economic Entomology*, *99*(6), 2048-2054. doi:10.1603/0022-0493-99.6.2048.

Jones, G. R., & Oldham, N. J. (1999). Pheromone analysis using capillary gas chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A*, *843*(1-2), 199-236. doi:10.1016/s0021-9673(99)00446-x.

Jurenka, R. (2004). Insect pheromone biosynthesis. In S. Schulz (Ed.), *The chemistry of pheromones and other semiochemicals I* (pp. 97-132). Berlin, Alemania: Springer.

Knight, A. L., Larsen, T. E., & Ketner, K. C. (2004). Rainfastness of a microencapsulated sex pheromone formulation for Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Economic Entomology*, *97*(6), 1987-1992. doi:10.1603/0022-0493-97.6.1987.

Kováts, E. (1958). Gas chromatographische charakterisierung organischer verbindungen. Teil 1: retentionsindices

aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone. *Helvetica Chimica Acta*, *41*(7), 1915-1932. doi:10.1002/hlca.19580410703.

Kydonieus, A. F., & Beroza, M. (1981). The Hercon dispenser formulation and recent test results. In M. Everett (Ed.), *Management of Insect Pests with Semiochemicals* (pp. 445-453). Boston, EE. UU.: Springer.

Lance, D. R., Leonard, D. S., Mastro, V. C., & Walters, M. L. (2016). Mating disruption as a suppression tactic in programs targeting regulated lepidopteran pests in US. *Journal of Chemical Ecology*, *42*(7), 590-605. doi:10.1007/s10886-016-0732-9.

Landolt, P. J., & Sivinski, J. (1992). Effects of time of day, adult food, and host fruit on incidence of calling by male Caribbean Fruit Flies (Diptera: Tephritidae). *Environmental Entomology*, *21*(2), 382-387. doi:10.1093/ee/21.2.382.

Lanucara, F., Holman, S. W., Gray, C. J., & Eyers, C. E. (2014). The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics. *Nature Chemistry*, *6*(4), 281-294. doi:10.1038/nchem.1889.

Lebreton, S., Trona, F., Borrero-Echeverry, F., Bilz, F., Grabe, V., Becher, P. G., ... Witzgall, P. (2015). Feeding regulates sex pheromone attraction and courtship in *Drosophila* females. *Scientific Reports*, *5*, 13132. doi:10.1038/srep13132.

Liénard, M. A., Strandh, M., Hedenström, E., Johansson, T., & Löfstedt, C. (2008). Key biosynthetic gene subfamily recruited for pheromone production prior to the extensive radiation of Lepidoptera. *BMC Evolutionary Biology*, *8*, 270. doi:10.1186/1471-2148-8-270.

Liénard, M. A., Wang, H.-L., Lassance, J.-M., & Löfstedt, C. (2014). Sex pheromone biosynthetic pathways are conserved between moths and the butterfly *Bicyclus anynana*. *Nature Communications*, *5*, 3957. doi:10.1038/ncomms4957.

Lievers, R., & Groot, A.T. (2016). Disposable polydimethylsiloxane (PDMS)-coated fused silica optical fibers for sampling pheromones of moths. *PLoS One*, *11*(8), e0161138. doi:10.1371/journal.pone.0161138.

Light, D. M., Grant, J. A., Haff, R. P., & Knight, A. L. (2017). Addition of pear ester with sex pheromone enhances disruption of mating by female codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in walnut orchards treated with meso dispensers. *Environmental Entomology*, *46*(2), 319-327. doi:10.1093/ee/nvw168.

Löfstedt, C., & Bengtsson, M. (1988). Sex pheromone biosynthesis of (E,E)-8,10-dodecadienol in codling moth *Cydia pomonella* involves E9 desaturation. *Journal of Chemical Ecology*, *14*(3), 903-915. doi:10.1007/bf01018782.

Malosse, C., Ramirez-Lucas, P., Rochat, D., & Morin, J.-P. (1995). Solid-phase microextraction, an alternative method for the study of airborne insect pheromones (*Metamasius hemipterus*, Coleoptera, Curculionidae). *Journal of High Resolution Chromatography*, *18*(10), 669-670. doi:10.1002/jhrc.1240181013.

Marchand, D., & McNeil, J. N. (2000). Effects of wind speed and atmospheric pressure on mate searching behavior in the aphid parasitoid *Aphidius nigripes* (Hymenoptera: Aphidiidae). *Journal of Insect Behavior*, *13*(2), 187-199. doi:10.1023/a:1007732113390.

Mayer, M. S., & Mitchell, E. R. (1998). Rapid measure of sex pheromone emission from plastic rope dispensers: Example of utility in sexual communication disruption of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Phytoparasitica*, *26*(2), 117-125. doi:10.1007/bf02980678.

McGhee, P. S., Gut, L. J., & Miller, J. R. (2014). Aerosol emitters disrupt codling moth, *Cydia pomonella*, competitively. *Pest Management Science*, *70*(12), 1859-1862. doi:10.1002/ps.3732.

Miller, D. R. (2007). Limonene: attractant kairomone for white pine cone beetles (Coleoptera: Scolytidae) in an eastern white pine seed orchard in western North Carolina. *Journal of Economic Entomology*, *100*(3), 815-822.

Millar, J. G., McElfresh, J. S., Romero, C., Vila, M., Marí-Mena, N., & Lopez-Vaamonde, C. (2010). Identification of the sex pheromone of a protected species, the Spanish Moon Moth *Graellsia isabellae*. *Journal of Chemical Ecology*, *36*(9), 923-932. doi:10.1007/s10886-010-9831-1.

Miller, J. R., & Gut, L. J. (2015). Mating disruption for the 21st century: matching technology with mechanism. *Environmental Entomology*, *44*(3), 427-453. doi:10.1093/ee/nvv052.

Môttus, E., Nômm, V., Williams, I. H., & Liblikas, I. (1997). Optimization of Pheromone Dispensers for Diamondback Moth *Plutella xylostella*. *Journal of Chemical Ecology*, *23*(9), 2145-2159. doi:10.1023/B:JOEC.0000006435.13481.ba.

Navarro, D. M., & Navarro, M. (2004). Catalytic hydrogenation of organic compounds without H2 supply: An electrochemical system. *Journal of Chemical Education*, *81*(9), 1350. doi:10.1021/ed081p1350.

Ó'Ceallacháin, D. P., & Ryan, M. F. (1977). Production and perception of pheromones by the beetle *Tribolium confusum*. *Journal of Insect Physiology*, *23*(10), 1303-1309. doi:10.1016/0022-1910(77)90074-9.

Onufrieva, K. S., Thorpe, K. W., Hickman, A. D., Tobin, P. C., Leonard, D. S., & Anderson Roberts, E. (2010). Effects of SPLAT® GM sprayable pheromone formulation on gypsy moth mating success. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *136*(2), 109-115.doi:10.1111/j.1570-7458.2010.01009.x.

Party, V., Hanot, C., Busser, D. S., Rochat, D., & Renou, M. (2013). Changes in odor background affect the locomotory response to pheromone in moths. *PLoS One*, *8*(1), e52897. doi:10.1371/journal.pone.0052897.

Pawliszyn, J., Pawliszyn, B., & Pawliszyn, M. (1997). Solid phase microextraction (SPME). *The Chemical Educator*, *2*(4), 1-7. doi:10.1007/s00897970137a.

Pellegrino, A .C., Penaflor, M. F., Nardi, C., Bezner-Kerr, W., Guglielmo, C. G., Bento, J. M., & McNeil, J. N. (2013). Weather forecasting by insects: modified sexual behaviour in response to atmospheric pressure changes. *PLoS One*, *8*(10), e75004. doi:10.1371/journal.pone.0075004.

Pregitzer, P., Schubert, M., Breer, H., Hansson, B. S., Sachse, S., & Krieger, J. (2012). Plant odorants interfere with detection of sex pheromone signals by male *Heliothis virescens*. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *6*, 42. doi:10.3389/fncel.2012.00042.

Prestwich, G. D., & Blomquist, G. J. (Eds.). (2014). *Pheromone biochemistry*. Londres, Reino Unido: Academic Press.

Rama, F., Reggiori, F., & Albertini, A. (2011). Control of *Spodoptera littoralis* (Bsdv.) by biodegradable, low dosage, slow-release pheromone dispensers. *IOBC/WPRS Bulletin*, *72*, 59-66.

Rodriguez, S. A., Paliza, M. L., & Nazareno, M. A. (2017). Influence of adsorbent nature on the dynamic headspace study of insect semiochemicals. *Australian Journal of Chemistry*, *70*(8), 902-907. doi:10.1071/CH17064.

Royer, L., & McNeil, J. N. (1993). Effect of relative humidity conditions on responsiveness of European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) males to female sex pheromone in a wind tunnel. *Journal of Chemical Ecology*, *19*(1), 61-69. doi:10.1007/BF00987471.

Sakurada, T., & Suzuki, H. (2002). *Google patent No. EP0816430 B1*. Biodegradable sustained-release preparation, biodegradable pheromone dispenser and biodegradable pest controlling agent. Recuperado de https://www.google.com/patents/EP0816430B1.

Saveer, A. M., Becher, P. G., Birgersson, G.r., Hansson, B. S., Witzgall, P., & Bengtsson, M. (2014). Mate recognition and reproductive isolation in the sibling species *Spodoptera littoralis* and *Spodoptera litura*. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *2*, 18. doi:10.3389/fevo.2014.00018.

Saveer, A. M., Kromann, S. H., Birgersson, G., Bengtsson, M., Lindblom, T., Balkenius, A., ... Ignell, R. (2012). Floral to green: Mating switches moth olfactory coding and preference. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *279*(1737), 2314-2322. doi:10.1098/rspb.2011.2710.

Schal, C., & Cardé, R. T. (1986). Effects of temperature and light on calling in the tiger moth *Holomelina lamae* (Freeman)(Lepidoptera: Arctiidae). *Physiological Entomology*, *11*(1), 75-87. doi:10.1111/j.1365-3032.1986.tb00392.x.

Schneider, D., & Kaissling, K.-E. (1957). Der bau der antenne des Seidenspinners *Bombyx mori* L. II. Sensillen, cuticulare bildungen und innerer bau. *Zoologische Jahrbücher. Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere*, *76*, 224-250.

Schwartz, C., Raible, J., Mott, K., & Dussault, P. H. (2006). Fragmentation of carbonyl oxides by N-oxides: An improved approach to alkene ozonolysis. *Organic Letters*, 8(15), 3199-3201. doi:10.1021/ol061001k.

Shorey, H. H., & Gerber, R. G. (1996a). Use of puffers for disruption of sex pheromone communication among navel orangeworm moths (Lepidoptera: Pyralidae) in almonds, pistachios, and walnuts. *Environmental Entomology*, *25*(5), 1154-1157. doi:10.1093/ee/25.5.1154.

Shorey, H. H., & Gerber, R. G. (1996b). Use of puffers for disruption of sex pheromone communication of codling moths (Lepidoptera: Tortricidae) in walnut orchards. *Environmental Entomology*, *25*(6), 1398-1400. doi:10.1093/ee/25.6.1398.

Shorey, H. H., McFarland, S. U., & Gaston, L. K. (1968). Sex pheromones of noctuid moths. XIII. Changes in pheromone quantity, as related to reproductive age and mating history, in females of seven species of Noctuidae (Lepidoptera). *Annals of the Entomological Society of America*, *61*(2), 372-376. doi:10.1093/aesa/61.2.372.

Spurgeon, D. (2003). Age dependence of pheromone production by the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology*, *32*(1), 31-38. doi:10.1603/0046-225X-32.1.31.

Stelinski, L., Gut, L., Mallinger, R., Epstein, D., Reed, T., & Miller, J. (2005). Small plot trials documenting effective mating disruption of oriental fruit moth by using high densities of wax-drop pheromone dispensers. *Journal of Economic Entomology*, *98*(4), 1267-1274. doi:10.1603/0022-0493-98.4.1267.

Unbehend, M., Hänniger, S., Meagher, R. L., Heckel, D. G., & Groot, A. T. (2013). Pheromonal divergence between two strains of *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Chemical Ecology*, *39*(3), 364-376. doi:10.1007/s10886-013-0263-6.

Wang, H.-L., Geertsema, H., Van Nieukerken, E. J., & Löfstedt, C. (2015). Identification of the female-produced sex pheromone of the leafminer *Holocacista capensis* infesting grapevine in South Africa. *Journal of Chemical Ecology*, *41*(8), 724-731. doi:10.1007/s10886-015-0611-9.

Webster, R. P., & Cardé, R. T. (1982). Influence of relative humidity on calling behaviour of the female European corn borer moth (*Ostrinia nubilalis*). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *32*(2), 181-185. doi:10.1111/j.1570-7458.1982.tb03200.x.

Wei, J. R., Yang, Z. Q., Hao, H. L., & Du, J. W. (2008). (R)-(+)-limonene, kairomone for *Dastarcus helophoroides*, a natural enemy of longhorned beetles. *Agricultural and Forest Entomology*, *10*(4), 323-330.

Witzgall, P., Kirsch, P., & Cork, A. (2010). Sex pheromones and their impact on pest management. *Journal of Chemical Ecology*, *36*(1), 21. doi:10.1007/s10886-009-9737-y.

Zabin, I. (1951). On the conversion of palmitic acid to stearic acid in animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, *189*(1), 355-359.

Capítulo 16

Comercialización de agentes de control biológico

Chapter 16

Commercialization of biological control agents

Martha Isabel Gómez,[1] Andrea Alarcón,[1] Marcela León,[1]
Cam Oehlschlager,[2] Leonardo Solórzano[1]

[1] Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA)

[2] ChemTica Internacional

Contenido

Introducción 766

Mercado de bioplaguicidas 766

- Segmentación del mercado por categoría 767
- Segmentación del mercado por tipo de agente de control biológico 768
- Segmentación por tipo de aplicación, formulación y cultivo 769
- Segmentación por región 770
- Empresas líderes en el mercado de bioplaguicidas 773

Dinámica del mercado de agentes de biocontrol 777

- Factores críticos que se deberían tener en cuenta para generar un nuevo producto de biocontrol para el mercado 777
- Fortalezas y debilidades de los productos de biocontrol 778
- Tendencias en el mercado de alimentos que favorecen el uso y venta de los agentes de control biológico 779
- Jalonadores del mercado 780
- Barreras del mercado 781
- Factores críticos en el proceso de comercialización de agentes de control biológico 783
- Modelos de negocios en la industria del biocontrol 784

Ejemplos de experiencias en el mercado del biocontrol 784

- Brasil: Laboratorio Farroupilha Lallemand 784
- Costa Rica: Uso de trampas de feromonas para el control de gorgojos de la palma 785
- Colombia: AGROSAVIA 786

Perspectivas de la industria del biocontrol 786

Conclusiones 790

Referencias 791

Resumen

En general, los bioplaguicidas solo representan un 5 % del mercado mundial de los productos fitosanitarios. Sin embargo, la industria del biocontrol está creciendo entre un 8 % y un 12 % anual, y se espera que el crecimiento para el 2020 sea entre el 15 % y el 20 %, es decir, una de las mayores perspectivas de crecimiento entre todos los subsectores de los agronegocios. Este panorama ha hecho que en los últimos cinco años haya crecido ampliamente el modelo de las grandes multinacionales que proyectan el tema de los bioplaguicidas como una nueva oportunidad para obtener beneficios, estableciendo nuevas unidades de negocio, ya sea realizando acuerdos comerciales o comprando medianas o grandes empresas con éxito en el biocontrol.

El crecimiento del mercado de los bioplaguicidas será impulsado por el uso de agentes de biocontrol en programas de manejo integrado de plagas (MIP) en combinación con productos químicos, por su uso en cultivos de gran extensión y alto valor económico, por el desarrollo de productos innovadores (nuevas formulaciones más estables y con varios usos, uso de herramientas moleculares, nuevos principios activos, etc.) y por presiones regulatorias y cambios en las políticas que piensan en la seguridad del medio ambiente. Lamentablemente, las propiedades favorables de los productos de control biológico, como la seguridad para el ser humano, la carencia de residualidad, la seguridad con el medio ambiente, etc., son difíciles de explotar en un precio de venta. La competencia se basa principalmente en factores tradicionales como la eficacia y costos.

Palabras clave

Biocontrol, bioplaguicidas, mercado, segmentos

Abstract

In general, biopesticides represents only 5 % of the world market for plant protection products. However, the biocontrol industry is growing by between 8 % and 12 % per year and its growth is expected to be between 15 % and 20 % by 2020, one of the largest growth prospects among all the sub-sectors of agribusiness. This scenario has made that large multinational companies projected the topic of biopesticides a new opportunity to obtain profits by establish in a new business unit, either by making commercial agreements or by buying successful biocontrol companies.

The growth of the biopesticides market will be driven by the use of biocontrol agents in Integrated Pest Management Programs (IPM) in combination with chemicals for their use in great extension crops with high economic value, by the development of new innovative products (more stable and multi-use formulations, new active principles, etc.) and by changes in the regulatory and policies that focus on environmental safety. Unfortunately, the favorable properties of biological control products such as safety for humans, lack of residuality, safety with the environment, etc., are difficult to exploit in a sale price. Competition is based primarily on traditional factors such as efficacy and costs.

Keywords

Biocontrol, biopesticides, market, segments

Introducción

Para la protección de diferentes cultivos, los bioplaguicidas se han venido desarrollando y usando durante más de cien años; sin embargo, muchos de estos productos biológicos no han tenido éxito en el mercado. El desarrollo de la industria de los bioplaguicidas tiene que ser tratado como una tarea estratégica, global y orientada hacia el futuro. Los bioplaguicidas no pueden reemplazar por completo los insecticidas químicos, pero en una producción agrícola sí pueden coexistir. Por lo tanto, debemos acelerar la aplicación de los resultados de la investigación y promover su desarrollo en el ámbito industrial, teniendo en cuenta que la comercialización es el paso final y más difícil en el desarrollo y en la introducción al mercado del biocontrol (Leng, Zhang, Pan, & Zhao, 2011).

El desarrollo y comercialización de bioplaguicidas ha atraído a muchas empresas durante los últimos 20 años. Muchos productos han llegado al mercado, pero la mayoría de ellos no han sido realmente exitosos. Muchas empresas han fracasado y han dejado este negocio. En general, el segmento del biocontrol a nivel mundial está asociado con aproximadamente 50 empresas que controlan el 60 % del mercado (Olson, 2015). Se puede considerar que una empresa tiene éxito cuando la producción y la venta de un bioplaguicida proporcionan un negocio sostenible, creciente y rentable que es capaz de desarrollar nuevos mercados y nuevos productos.

La demanda por agentes de biocontrol será impulsada por su uso en programas de manejo integrado de plagas (MIP) en combinación con productos químicos, en cultivos de gran extensión y alto valor económico, y por las mejoras tecnológicas constantes y nuevos avances que se den para estos productos. Por otra parte, las tendencias medioambientales apoyan la teoría de que la demanda de nuevos productos para la protección de cultivos crecerá rápidamente para reemplazar algunos agroquímicos convencionales y, por lo tanto, los agentes de biocontrol ofrecen una variedad de oportunidades para el desarrollo de estos nuevos mercados (Van Lenteren, Bolckmans, Köhl, Ravensberg, & Urbaneja, 2017). Por tal razón, en los últimos años muchos grupos de investigación de la academia y de la industria han enfocado sus esfuerzos en la mejora de todo tipo de características biológicas y técnicas de los agentes de biocontrol, para el desarrollo de mejores productos. No obstante, hay muchos factores que influyen en la adopción final de los bioplaguicidas en el mercado y su éxito se basa en su eficacia, estabilidad, facilidad de uso, demostración de la rentabilidad sobre la inversión para los usuarios finales y costos de producción (Ravensberg, 2011).

Mercado de bioplaguicidas

Los bioplaguicidas actualmente son utilizados en más de 30 millones de hectáreas en el mundo. En general, se utilizan aproximadamente 350 especies de agentes de control biológico, representadas en más de 500 productos comerciales a nivel global. Europa controla el mercado de insectos benéficos y EE. UU., el de productos microbianos. Sin embargo, aunque los bioplaguicidas solo representan un 5 % del mercado mundial de los productos fitosanitarios (Olson, 2015), la industria del biocontrol está creciendo entre un 8 y un 12 % anual, y se espera que el crecimiento para el 2020 sea entre el 15 % y el 20 %, lo que representará un mercado de US$6,6 billones, y para el 2025 de US$7 billones (Dunham y Dunham, 2015; Olson, 2015; Ravensberg, 2015).

Se espera que para el 2018 se presente un alto crecimiento del mercado de bioplaguicidas en Europa, llegando a sobrepasar el mercado de Norteamérica, región que actualmente consume cerca del 40 % de la producción mundial de bioplaguicidas, con un mercado de alrededor de US$205 millones, y se espera que aumente aproximadamente a US$300 millones a finales de la década. En América Latina, el mercado de bioplaguicidas representa un 17 % del mercado mundial y el aumento de las ventas está asociada al creciente aumento del biocontrol en Brasil. Por otra parte, se espera que el mercado asiático presente un gran

crecimiento, por las megaeconomías de China e India (Leng et al., 2011). Se espera que la demanda mundial de bioplaguicidas microbianos crezca a una tasa anual compuesta de 20,2 % para el 2020. Entre las décadas de 2040 y 2050, según algunas proyecciones teóricas, los bioplaguicidas podrían igualar a los productos de síntesis química en términos de tamaño de mercado, debido principalmente al crecimiento de este en África y Asia (Olson, 2015).

Segmentación del mercado por categoría

El mercado de bioplaguicidas se puede segmentar, dependiendo del uso del agente de biocontrol utilizado, en bioinsecticidas, biofungicidas, bionematicidas y bioherbicidas. El mercado mundial de bioplaguicidas se estimó entre US$1.700 millones y US$3.000 millones para el 2015, principalmente por el uso de insectos benéficos y productos microbianos (Van Lenteren et al., 2017).

Los bioinsecticidas incluyen bacterias, virus y hongos para el control de insectos, y dominan el mercado con una participación aproximada del 50 % (Dunham & Dunham, 2015). *Bacillus thuringiensis* (Bt) es el bioinsecticida más ampliamente usado a nivel mundial. En Estados Unidos se encuentran varios productos registrados a base de este microorganismo como Florbac, BMP, Gnatrol, Aquabac, M-Trak, Agree WG, Thuricide, Forestry, Wilbur-Ellis BT 320, Dust, Dipel, Deliver, Biobit HP, Foray, Javelin WG, Green Light, Hi-Yield Worm Spray, Ferti-Lome, Bonide, Britz BT, Worm Whipper, Security Dipel Dust, BMP 123, Condor, Novodor, Lepinox WDG, entre otros (Mishra, Tewari, Singh, & Kumar, 2015). En Colombia, se encuentran registrados 20 bioplaguicidas, entre los que se encuentran Dipel WG, Turilav, Ecotech Bio WP, Ecotech Pro, Turivec, Bassar WP, Bak-Tur WP, BT-Nova WP, Safer Mix WP y BT-Biox (Instituto Colombiano Agropecuario [ICA], 2017b).

Los biofungicidas son formulaciones de organismos vivos que se utilizan para controlar la actividad de los hongos patógenos de las plantas y tienen una participación en el mercado de bioplaguicidas del 40 % aproximadamente (Dunham & Dunham, 2015). Los microorganismos biocontroladores son hongos o bacterias de vida libre, activos en raíces, suelos y ambientes foliares. Estos microorganismos producen una amplia gama de sustancias antibióticas, además de que parasitan o compiten con otros hongos (Dicklow, 2017). Por lo general, se supone que los biofungicidas son más preventivos que curativos, por lo que se aplican a los cultivos antes del ataque de los patógenos. *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. son los biofungicidas más empleados a nivel mundial (Mishra et al., 2015).

Trichoderma spp. se comercializa a nivel mundial con productos como Tenet, Bioten, Remedier, Binab, RootShield, T-22 Planter box, Trichodex y Binab T. Para el caso de *Bacillus* spp., los productos más conocidos en el mercado de Estados Unidos son EcoGuard, BacJ, GB34, Sonata, Ballad Plus, Companion, Kodiak, Histick N/T Pro-Mix y Taegro, mientras que para la bacteria *Pseudomonas* spp. se comercializan Spot-Less, At-Eze, Bio-Save 10LP y Bio-Save 11LP (Mishra et al., 2015). En Colombia, se encuentran registrados, a junio de 2017, 33 productos a base del hongo *Trichoderma* spp., 28 productos a base de la bacteria *Bacillus* spp. y no hay productos registrados a base del género *Pseudomonas* spp. (Instituto Colombiano Agropecuario [ICA], 2017b).

Los herbicidas biológicos actúan para el control de las malezas y, según Dunham y Dunham (2015), corresponden al 1 % del mercado global. Actualmente, hay muy pocos productos comerciales disponibles en el mercado; sin embargo, los herbicidas a base de *Alternaria* spp. son los más empleados a nivel mundial (Mishra et al., 2015).

En el mercado de bioherbicidas en Estados Unidos, se encuentran productos a base de *Bacillus cereus* (MepPlus), *Alternaria destruens* (Smolder), *Chondrostereum purpureum* (Chontrol Paste), *Colletotrichum gloeosporioides* (LockDown) y *Puccinia thlaspeos* (Woad Warrior) (Mishra et al., 2015). En Colombia, no existe ningún producto registrado como bioherbicida hasta el momento.

Por otra parte, los bionematicidas son productos biológicos utilizados para controlar nematodos parásitos de las plantas. En ellos se incluyen hongos y bacterias con la capacidad de parasitar o matar a los nematodos (Instituto para la Innovación Tecnológica en

Agricultura [Intagri], 2017) y tienen una participación en el mercado del 4 % (Dunham & Dunham, 2015). Dentro de los microorganismos con mayor potencial de control sobre nematodos se destacan las bacterias *Tsukamurella paurometabola* y *Pasteuria penetrans*, y los hongos *Paecilomyces lilacinus*, *Pochonia chlamydosporia* y *Arthrobotrys irregularis*, siendo los hongos los más promisorios en el control de nematodos (Novasys Pharma, 2017). Este grupo diverso de hongos se caracteriza por colonizar y parasitar a nemátodos; algunos de ellos son parásitos obligados, pero la mayoría son saprófitos facultativos, es decir, cuando no hay nematodos pueden alimentarse de materia orgánica en descomposición (Intagri, 2017). El potencial de *Pasteuria penetrans* se debe principalmente a que su multiplicación se produce dentro del pseudoceloma de los nematodos infectados, ocasionando pérdida de la fecundidad. Cuando el nematodo se descompone, las esporas de la bacteria son liberadas y permanecen en el suelo, quedando disponibles para infestar un nuevo nematodo. El género *Bacillus* también tiene propiedades nematicidas, ya que sus toxinas afectan la morfología de los huevos; los nematodos juveniles, como el *Bacillus firmus*, tienen la capacidad de colonizar *Meloidogyne* spp. y destruir sus huevos (Novasys Pharma, 2017).

En el mercado de bionematicidas en Estados Unidos, se encuentran productos como BioNem, a base de *Bacillus firmus*; Econem, a base de *Pasteuria usage*; DiTera, a base de *Myrothecium verrucaria*, y MeloCon WG, a base de *Paecilomyces lilacinus*. Por otra parte, en el mercado europeo se encuentran productos como BioAct WG, a base de *P. lilacinus* (Mishra et al., 2015), mientras que en el mercado colombiano se encuentran nueve bionematicidas registrados (Micosplag Wp, Biostat Wp, Nemocrop Wp, Safelomyce S Wp, Nemata Sc, Nemaroot, Huesped Sc Mycros, Safersoil Wp y Nemagrip Wp) (ICA, 2017b).

Segmentación del mercado por tipo de agente de control biológico

En varios estudios de mercado de bioplaguicidas, estos se suelen segmentan por su origen en tres categorías: los bioplaguicidas microbianos, los bioplaguicidas bioquímicos y los insectos benéficos. Los productos microbianos son fabricados a base de virus, bacterias u hongos vivos o muertos, o la combinación de estos con sus metabolitos. Los productos bioquímicos usan sustancias no tóxicas como feromonas y extractos de plantas. Por otra parte, los insectos benéficos corresponden a parasitoides, depredadores o parásitos (Mishra et al., 2015). La categoría de microbianos dominó el mercado en el 2015, con una participación de US$1,3 billones (Dunham & Dunham, 2015); en segundo lugar, se encuentran los productos bioquímicos con US$930,5 millones; en tercer lugar, están los insectos benéficos con un mercado de US$382,1 millones (Markets and Markets, 2017).

Bioplaguicidas microbianos

Los productos microbianos normalmente son divididos en cinco subcategorías:

- **Bacterias.** Son los microbianos más utilizados y dominan cerca del 74 % del mercado de bioplaguicidas (Mishra et al., 2015). La bacteria más comúnmente usada para el desarrollo de productos es *Bacillus thuringiensis*, aunque existe otra bacteria con capacidad insecticida utilizada: *Bacillus sphaericus*. Para el tratamiento de enfermedades fúngicas, se han utilizado ampliamente bacterias como *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas* spp. y *Streptomyces* spp. (Sundari, Singh, & Yadava, 2016).
- **Hongos**. Son utilizados tanto para el control de insectos plagas y de enfermedades y representan aproximadamente el 10 % del mercado de bioplaguicidas (Mishra et al., 2015). El hongo más usado a nivel comercial es *Trichoderma* spp., que ha demostrado la capacidad de colonizar fácilmente las raíces de las plantas sin afectarlas, lo que lo hace un excelente agente de biocontrol. Por otro lado, *Beauveria bassiana* también se utiliza ampliamente como controlador de muchas especies de insectos plagas tales como áfidos, trips y moscas blancas, entre otros (Sundari et al., 2016).
- **Virus**. Los bioplaguicidas microbianos conocidos como baculovirus son una familia de virus específicos de insectos y tienen una participación del 5 % del mercado de bioplaguicidas (Mishra et al., 2015).

El granulovirus de la polilla de la manzana *Cydia pomonella* o CpGV es un buen ejemplo de un insecticida viral comercialmente exitoso (Sundari et al., 2016).

- **Protozoos**. Los protozoos son organismos eucariotas unicelulares que existen tanto en el agua como en el suelo, y varias especies son parásitos de insectos. Por ejemplo, el protozoo *Nosema locustae* es conocido por ser un agente de biocontrol natural de muchas especies de saltamontes, que causan grandes daños en forrajes (Biopesticide Industry Alliance [BPIA], 2014).

- **Levaduras**. Estos hongos unicelulares se usan especialmente para el control de patógenos en poscosecha. Por ejemplo, *Candida oleophila*, aislada por primera vez de las manzanas doradas, se ha convertido en un bioplaguicida eficaz para el control de las pudriciones frutales en poscosecha (Biopesticide Industry Alliance [BPIA], 2017). En Estados Unidos, se encuentra registrado el producto Nexy a base de este microorganismo (Mishra et al., 2015).

Bioplaguicidas bioquímicos

Dentro de los productos bioquímicos están las feromonas sexuales de insectos, que interfieren con el apareamiento, así como los extractos de plantas que atraen insectos (Plant Health Care [PHC], 2017; Sundari et al., 2016). Su mercado corresponde aproximadamente al 3 % del mercado global de bioplaguicidas (Mishra et al., 2015) y se espera que el mercado mundial de feromonas llegue a US$2.450 millones para el 2020 (Grand View Research, 2017).

Norteamérica dominó el mercado mundial de feromonas en el 2013, con más del 50 % de participación, y se espera que continúe dominando a causa del desarrollo tecnológico y del aumento de los rendimientos agrícolas en Estados Unidos, Canadá y México. Por su parte, Europa representó más del 20 % del mercado total de feromonas en el 2013 (Grand View Research, 2017).

Las feromonas sexuales se usan ampliamente para la interrupción del apareamiento, reduciendo el número de larvas en las plantas y protegiendo los cultivos. Se espera que las feromonas sexuales experimenten un crecimiento más rápido con una tasa de crecimiento anual compuesta del 5 % entre el 2014 y el 2020. Este crecimiento estará dado especialmente por la adopción extensiva de programas de MIP por parte de los agricultores, junto con las iniciativas gubernamentales (Grand View Research, 2017).

Las empresas clave participantes del mercado en producción de feromonas son Shin-Etsu Chemicals, Suterra LLC, Syngenta Bioline, Russell IPM, Sumi Agro France y Hercon Environmental, AgBiTech, Agrichembio, Agrochem, ATGC Biotech, Atlas Agro, SemiosBIO y Trécé Inc (Grand View Research, 2017).

Insectos benéficos

Dentro de los insectos benéficos se encuentran los parasitoides y los depredadores, cuyo alimento esencial son los insectos fitófagos. Los parasitoides se alimentan y desarrollan en el interior o exterior de un insecto durante todo su ciclo de vida; en cambio, los depredadores completan su ciclo de vida a partir de varios insectos (Rubio & Fereres, 2002).

Los insectos benéficos representan el 8 % del mercado de los agentes de control biológico (Mishra et al., 2015). En 2016, en términos de volumen, Norteamérica representó la mayor cuota de mercado de insectos benéficos, seguido por Europa y Asia-Pacífico. Los principales actores identificados en el mercado global de estos son Dudutech Ltd. (Kenia), Koppert BV (Holanda), BioBest NV (EE. UU.), Applied Bio-Nomics Ltd. (Canadá) y Bioline AgroSciences Ltd. (Reino Unido) (AgroNews, 2017).

Segmentación por tipo de aplicación, formulación y cultivo

El mercado de agentes de biocontrol se puede segmentar por el tipo de aplicación, teniendo en cuenta los productos de aplicación foliar, los productos de aplicación al suelo, los productos usados para poscosecha y los productos usados para el tratamiento de semillas. Las aplicaciones más comunes son las foliares y al

suelo: las primeras son muy usadas en control de insectos plaga y de enfermedades; las segundas, como una práctica común realizada antes de la siembra que favorece la germinación de la semilla, el uso eficiente de nutrientes, el mejor desarrollo de la planta, y el control preventivo de insectos plaga, enfermedades y malezas.

Por otra parte, los productos para peletizar semillas han tenido un alto desarrollo debido a su uso combinado con productos químicos, obteniendo sinergias muy importantes para el manejo de diversos problemas fitosanitarios, además de permitir un mejor resultado en las etapas de emergencia de semillas y desarrollo de plántulas (Himmel, 2013). La aplicación de bioplaguicidas en poscosecha es el mercado menos desarrollado e, inicialmente, está dirigido a la producción orgánica de frutas y hortalizas en la que se utilizan principalmente levaduras (Mishra et al., 2015). Para el 2013, su mercado se estimó en un valor de US$35,9 millones, teniendo Europa una participación del 45 % (MicroMarket Monitor, 2015). Sin embargo, debido a las altas pérdidas en poscosecha, tanto en países desarrollados (5 % a 20 %) como en países en vía de desarrollo (25 a 50 %), se espera que este mercado aumente considerablemente en los próximos años (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 2015).

Por otra parte, teniendo en cuenta el tipo de formulación que se utiliza para estabilizar los agentes de biocontrol durante su distribución y almacenamiento, podemos dividir las formulaciones en sólidas y líquidas. Dentro de las formulaciones sólidas se encuentran los productos diseñados como polvo mojable, polvo para espolvoreo y de aplicación directa, y los granulados, representando aproximadamente el 40 % del mercado total de bioplaguicidas. Los usos de formulaciones líquidas representan el 60 % del mercado, y pueden ser acuosas u oleosas, e incluyen las suspensiones concentradas, las dispersiones oleosas, las emulsiones y las suspoemulsiones (Sundari et al., 2016).

Respecto a la segmentación de los bioplaguicidas por tipo de cultivos, se estima que el 55 % de las ventas actuales son para uso en cultivos hortícolas. No obs-tante, estas tecnologías se están utilizando cada vez más en cultivos de grandes extensiones como el maíz, la soya y los cultivos forrajeros (BPIA, 2014), que son de gran importancia en el consumo humano y en la producción pecuaria (Alexandratos & Bruinsma, 2012). Por ejemplo, de acuerdo con el *Directory of Biopesticides for Agricultural Crops in OECD Countries*, en el 2013 para el cultivo de maíz se tenían 119 registros de productos biológicos, para el cultivo de algodón 69 y para soya 96, tres grandes cultivos representativos por su área a nivel mundial (Agriculture and Agri-Food Canada, 2013).

Segmentación por región

El mercado global de bioplaguicidas al 2015 fue liderado por Norteamérica con una participación del 38 %, seguido por Europa con una participación del 25 % y por Asia-Pacífico con el 20 %. Latinoamérica participó con un 17 %, y el 4 % restante del mercado estuvo distribuido en el resto del mundo (Dunham & Dunham, 2015; Leng et al., 2011; Olson, 2015).

Norteamérica

El mercado de bioplaguicidas en Norteamérica es liderado principalmente por tres países: Estados Unidos, Canadá y México (Mishra et al., 2015), y se estima un mercado de US$1.658,1 millones para el 2019, con una tasa de crecimiento del mercado del 15 % (MicroMarket Monitor, 2017c).

Europa

El mercado de bioplaguicidas en Europa es liderado principalmente por cinco países: España, Italia, Francia, Alemania y Reino Unido (Mishra et al., 2015), y se estima un mercado de US$2.117 millones para el 2020, con una tasa de crecimiento del mercado del 20,5 % (MicroMarket Monitor, 2017a).

Asia-Pacífico

El mercado de bioplaguicidas en la zona Asia-Pacífico es liderado principalmente por cuatro países: China, Japón, India y Australia (Mishra et al., 2015), y se estima un mercado de US$827,3 millones para el

2019, con una tasa de crecimiento del 15 % de 2014 a 2019 (MicroMarket Monitor, 2017b).

Centroamérica y Suramérica

El mercado de bioplaguicidas en América Latina es liderado principalmente por dos países: Brasil y Argentina (Mishra et al., 2015), y se estima un mercado de US$144,71 millones para el 2019 (Mordor Intelligence, 2017).

Brasil

Brasil es el mayor exportador mundial de productos a base de soya, productos forestales, carne, azúcar, café, naranja, tabaco y etanol. La agricultura brasileña genera un 28 % de su producto interno bruto (PIB) y es el quinto país agrícola mundial. Para el 2015, el mercado de agroquímicos cayó en un 21 %, debido a un mercado global estancado, moneda local debilitada y una crisis política y financiara a nivel local. No obstante, el mercado del biocontrol ha seguido creciendo a tasas superiores al 15 % anual. El mercado brasileño de biocontrol está conformado por 59 empresas que cuentan con 132 productos registrados, 91 bioproductos a base de bacterias, hongos y virus, y otros 41 a base de depredadores y parasitoides. Durante los últimos años, las tendencias globales de consolidación en el mercado de biocontrol con grandes empresas también llegaron a Brasil; en la tabla 16.1 se listan cronológicamente las empresas que realizaron adquisiciones, alianzas o fusiones con empresas brasileras de control biológico (Trebilcock, 2016a).

Dentro de los principales agentes de control biológico registrados en Brasil se encuentran los parasitoides como *Cotesia* sp. y *Trichogramma* sp. para el control de *Diatraea saccharalis*; el hongo *Metarhizium anisopliae* se usa para el control del insecto *Mahanarva* sp. en caña de azúcar, y el hongo *Trichoderma* sp., para el control de *Sclerotinia* en Soya (Trebilcock, 2016a). Un dato importante, que fomentó el mercado del control biológico en Brasil, fue la invasión de *Helicoverpa armígera* en el 2012, que causó daños en los cultivos de maíz, algodón y soya. Como los insecticidas no fueron eficientes debido a la resistencia o porque simplemente no estaban disponibles, la emergencia hizo que se aprobara como único método de control el uso de productos a base de la bacteria *Bacillus thuringiensis* y de baculovirus (Pratissoli, Lima, Pirovani, & Lima, 2015).

Tabla 16.1. Adquisiciones, alianzas y fusiones de empresas externas en Brasil

Año	Adquisición
2010	Novozymes adquirió a Turfal
2012	Koppert Biological Systems adquirió a Itaforte Bioproductos Limitada
2013	Novozymes alianza global con Monsanto
2013	Bug Agentes Biológicos se fusionó con ProMip
2013	SGS adquirió a Gravena
2015	ProMip adquirió a Insecta Agentes Biológicos
2015	Uniao química adquirió a Bthek
2016	Lallemand adquirió a laboratorio Farroupilha
2016	Stoller adquirió a Rizoflora Biotechnology

Fuente: Adaptada de Trebilcock (2016a)

Cuba

Los bioproductos en Cuba surgieron para sustituir importaciones de insumos agrícolas, con el fin de suplir necesidades de nitrógeno y fósforo en el campo de los fertilizantes y el control de plagas y enfermedades a nivel fitosanitario.

Con la introducción masiva de los productos biológicos, se ha logrado reducir entre un 60 y 70 % el empleo de plaguicidas de síntesis. Los ingredientes activos de los bioplaguicidas desarrollados en Cuba son principalmente *Bacillus thuringiensis, Beauveria bassiana, Metarhizium, Lecanicillium, Trichoderma* y *Nomuraea*, entre otros (Trebilcock, 2016a).

Argentina

Argentina es el tercer mayor productor de soya del mundo. El cultivo de soya es un gran consumidor de nitrógeno, pues necesita cuatro veces más que los cereales, razón por la cual el uso de inoculantes es más importante que el uso de agentes de biocontrol. Hoy hay 108 empresas registradas en el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (Senasa), que ofrece un total de 640 productos inoculantes. El mercado es muy dinámico y ha habido fusiones y adquisiciones. La más reciente compra de una empresa, equivalente a un 60 % de Rizobacter, se hizo por parte de Bioceres en 2015. Rizobacter también tiene un *joint venture* con la empresa francesa DeSangosse para la producción de fertilizantes. En el 2014, Bayer Crop Science adquirió a Biogran (la tercera empresa más grande en Argentina). Además, BASF adquirió a Becker Underwood y abrió su planta de producción en Rosario. La Bio Ag Alliance (acuerdo entre Monsanto y Novozymes) también participa en el mercado a través de Nitragin, la mayor empresa de inoculantes de Argentina que es controlada por Novozymes (Trebilcock, 2016a).

México

El mercado mexicano de biocontrol se estima entre US$120 y 150 millones, y su tasa de crecimiento anual se estima en al menos un 17 % anual. Los expertos indican que los biológicos representan entre un 10 y un 15 % del mercado nacional de productos fitosanitarios. El biocontrol se utiliza ampliamente en invernadero, cultivos orgánicos y exportadores de hortalizas. Los dos microorganismos más ampliamente estudiados y comercializados son *Trichoderma* y *Bacillus*. Adicionalmente, entre 1890 y 1970, México aportó al mundo una serie de biocontroladores (23 parasitoides, 13 depredadores y 10 especies de insectos) que fueron exportados para controlar plagas en al menos 15 países. Las empresas Biobest y Koppert establecieron sus plantas de producción en México para producción de biocontroladores y polinizadores para cultivos de invernadero y al aire libre. Además, México es el tercer mayor productor de *Trichogramma* spp. en el mundo después de China y Rusia (Trebilcock, 2016a).

Chile

Chile es uno de los mayores exportadores de alimentos del hemisferio sur. En el 2015, las exportaciones de frutas, hortalizas frescas y procesadas, vino, salmón, carnes y otros productos agrícolas totalizaron US$18.000 millones. En Chile existen 70 empresas que fabrican o comercializan productos biológicos, y que cuentan con 389 productos de los que 210 son importados. Un 50 % de las empresas son importadoras, 34 % son fabricantes y 16 % realizan ambas actividades. Los bioplaguicidas más importantes incluyen los extractos de cítricos, seguida de extractos de neem, *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp., *Beauveria bassiana* y *Metarhizium* spp., con un mercado estimado en cerca de US$7,5 millones. La empresa BASF estableció una planta en Chile para la producción de extractos botánicos a partir del árbol del quillay, y está exportando nematicidas, adyuvantes y bioestimulantes (Trebilcock, 2016a).

Colombia

En Colombia hay una larga tradición respecto al uso de productos comerciales de biocontrol desde la década de los años setenta, con el uso de baculovirus importado desde EE. UU. para controlar *Trichoplusia ni* y *Heliothis* spp. en el cultivo de algodón, y más adelante, en la década de los años noventa, el Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé) promovió la producción de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café (*Hypothenemus hampei*), lo que estimuló el desarrollo del control

microbiano tanto por productores como por centros de investigación (Cotes, 2014). Sobre el valor del mercado actual de bioplaguicidas no se tiene información específica; sin embargo, se encuentra que para el 2012 se vendieron aproximadamente 590 toneladas de productos (entre sólidos y líquidos) (Instituto Colombiano Agropecuario [ICA], 2012). Tomando estos datos, junto con los ingresos anuales de algunas compañías y de acuerdo con entrevistas hechas a diferentes empresas del sector, se estima que el mercado podría tener un valor aproximado de 2 a 5 millones de dólares por año.

Para conocer la evolución del sector de los bioplaguicidas, se plantea el análisis desde la perspectiva del número de registros de empresas de bioinsumos y el número de registros de venta de productos ante el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Es así como para el 2007 se tenían 42 empresas registradas y, en 10 años, esta cantidad se cuadruplicó; actualmente, para el 2017, se cuenta con 167 empresas (ICA, 2017a). A nivel de registros de venta de productos, se puede ver una evolución importante, pasando de ocho registros en la categoría de bioplaguicidas para el 2007 a 133 registros en esta misma categoría para el 2017, de los cuales el 68 % corresponde a productos microbianos, 19 % a extractos vegetales, 9 % a productos bioquímicos y 4 % a parasitoides y depredadores. Relacionando las empresas con los registros de venta de productos, se evidencia que 17 compañías cuentan con el 57 % de los registros de productos ante el ICA (ICA, 2017b).

El modelo usado normalmente por las empresas para la venta de sus productos es el uso de distribuidores nacionales o internacionales para las empresas interesadas en mercados del exterior. Revisando de manera específica los registros de venta de productos ante el ICA y relacionándolos con las principales empresas se obtiene la siguiente información:

- En la categoría de agentes microbianos, 90 productos cuentan con resolución vigente y se destacan las empresas como Bio-Crop, Orius Biotecnología, Soluciones Microbianas del Trópico, Mycros, Biocultivos, Natural Control, Sanitex, Bayer SA, Laverlam (LAM), Core Biotechnology, Live Systems Technology y AGROSAVIA, las cuales cuentan con el 60 % de los registros mencionados. Los microorganismos más importantes usados como ingredientes activos en esta categoría son *Bacillus* spp., *Trichoderma* spp., *Beauveria* spp., *Metarhizium* spp. y *Paecilomyces* spp.

- Para el caso de los extractos vegetales, existen 25 productos registrados, y se destacan las empresas Ecoflora Agro, ADN adelante, Alteo, Safer Agrobiológicos, Agrobiológicos del ajo y BAM con el 64 % de registros de productos dentro de esta clase. Dentro de los principales ingredientes activos están el extracto de ajo, ají y sophora.

- En la categoría de productos bioquímicos, existen 12 productos con registro vigente, y sobresale la empresa Safer Agrobiológicos con el 58 % de estos. Los principales ingredientes activos usados son el 4-allyl-1,2-dimethoxybenzene y el acetato de E-3 dodecenilo.

- Finalmente, en la categoría de parasitoides y depredadores, hay seis productos y sobresalen las empresas Koppert, Bichopolis y Perkins, que poseen el 66 % de los registros dentro de esta clasificación, con productos como *Phytoseiulus persimilis* y *Trichogramma exiguum* (ICA, 2017b).

Empresas líderes en el mercado de bioplaguicidas

Dentro de las industrias que lideran el mercado de bioplaguicidas a nivel mundial, se encuentran 12 empresas que se listan en la tabla 16.2. Estas empresas se encuentran ubicadas principalmente en Norteamérica y Europa. Se aprecian dos categorías dentro de las principales empresas líderes del mercado: en la primera están las empresas reconocidas en el mercado de agroquímicos (Bayer BASF, DOW y Monsanto), que han incluido dentro de sus portafolios los bioinsumos a través de movimientos en el mercado como adquisiciones, inversiones, fusiones u otro tipo de acuerdos con actores del biocontrol; en la segunda hay empresas dedicadas a los productos biológicos (Isagro, Camson, Marrone, Bioworks, Koppert, Neudorf, Valent, Certis) con alcance global a través de su marca propia o a través de acuerdos de licenciamiento con empresas locales.

Tabla 16.2. Empresas líderes en el mercado de bioplaguicidas y sus ofertas

Compañía	Productos	Agentes activos	Actividad biológica
Bayer Crop-Science Ag. Alemania	Serenade	*Bacillus subtilis*	Control de patógenos fúngicos y bacterianos y mejora el crecimiento de los cultivos
	Sonata	*Bacillus pumilus*	Control de mildeo
	Requiem	Extracto de *Chenopodium ambrosioides*	Control de mosca blanca, áfidos, ácaros y trips.
	BioAct	*Paecilomyces lilacinus*	Control de nemátodos en frutas y vegetales
Basf SE. Alemania	Millenium Biocontrol	*Steinernema carpocapsae*	Control de insectos en frutas, nueces y cultivos ornamentales
	Nemasys Biocontrol	*Steinernema feltiae*	Control de mosquitos y trips en flores
	Nemasys G Biocontrol	*Heterorhabditis bacteriophora*	Control de larva blanca y escarabajos
	Nemasys L Biocontrol	*Steinernema kraussei*	Control del gorgojo de la vid negra
	Integral Clarity Subtiles	*Bacillus subtilis*	Control de *Rhizoctonia* y *Fusarium*
	Beta-pro	*Bacillus thuringiensis*	Control del gusano de la cápsula africana y polilla de espalda de diamante
	Nogall	*Agrobacterium radiobacter*	Protege los cultivos contra diversas plagas bacterianas
Dow Chemical Company. Estados Unidos	Conserve	Spinosad	Control de insectos (gusanos y hormigas)
	Static Spinosad ME	Spinosad	Control de moscas de la fruta
	Tracer	Spinosad	Control de orugas y trips
	Entrust SC Naturalyte	Spinosad	Control de insectos, ácaros y nematodos en frutas, verduras y cereales
	Success Neo	Spinetoram	Control de ácaros, trips, orugas y depredadores en vegetales, frutas y forrajes
	Delegate 250 WG	Spinetoram	Control de orugas, moscas y trips en pera y cerezas
	Radiant SC	Spinetoram	Control de insectos en frutas y verduras
Monsanto Company. Estados Unidos	Actinovate AG	*Streptomyces lydicus*	Control de enfermedades foliares y del suelo en cultivos al aire libre
	Met52 EC	*Metarhizium anisopliae*	Control de insectos en vegetales, frutas y ornamentales
	Met52 G	*Metarhizium anisopliae*	Control del gorgojo negro de la Vid y larvas y pupas de trips en ornamentales y flores

(Continúa)

(Continuación tabla 16.2)

Compañía	Productos	Agentes activos	Actividad biológica
Isagro SPA. Italia	Bio Tam	*Trichoderma gamsii* + *T. asperellum*	Control de hongos, bacterias y nematodos en el suelo en hortalizas, ornamentales y prados
	Bioten	*Trichoderma gamsii* + *T. asperellum*	Control de hongos, bacterias y nematodos en el suelo en hortalizas, ornamentales y prados
	Radix	*Trichoderma gamsii* + *T. asperellum*	Control de hongos, bacterias y nematodos en el suelo en hortalizas, ornamentales y prados
	Remedier	*Trichoderma gamsii* + *T. asperellum*	Control de hongos, bacterias y nematodos en el suelo en hortalizas, ornamentales y prados
	Tenet	*Trichoderma gamsii* + *T. asperellum*	Control de hongos, bacterias y nematodos en el suelo en hortalizas, ornamentales y prados
Camson Bio Technologies Limited. India	Calphomil	Información no disponible	Control de *Phytophthora, Pythium* y mildeo velloso
	Calbase	Información no disponible	Control de *Phytophthora, Pythium, Fusarium* y *Rhizoctonia*
	Calderma	*Trichoderma viride* + *T. harzianum*	Controla *Fusarium, Pythium, Rhizoctonia* y *Sclerotium*
	Caltop	Mezcla de enzimas	Control de Mildeos polvosos y *Cercospora*
Marrone Bio Innovations Inc. Estados Unidos	Regalia	*Reynoutria* spp.	Control de enfermedades en varios cultivos
	Grandevo	*Chromobacterium subtsugae*	Control de enfermedades en cítricos, verduras y frutos
	Remedier	*Trichoderma asperellum* + *T. gamsii*	Control de enfermedades fúngicas y bacterianas en diferentes cultivos
	Zequanox	*Pseudomonas fluorescens*	Control de enfermedades en diferentes cultivos
Bioworks, Inc. Estados Unidos	RootShield Plus + WG	*Trichoderma harzianum* + *Trichoderma virens*	Control de *Phytophthora, Pythium, Fusarium, Rhizoctonia, Thielaviopsis* y *Cylindrocladium*
	RootShield Plus + WP	*Trichoderma harzianum* + *Trichoderma virens*	Control de *Phytophthora, Pythium, Fusarium, Rhizoctonia, Thielaviopsis* y *Cylindrocladium*
	RootShield WG	*Trichoderma harzianum*	Control de *Pythium, Fusarium, Rhizoctonia, Thielaviopsis* y *Cylindrocladium*
	RootShield WP	*Trichoderma harzianum*	Control de *Pythium, Fusarium, Rhizoctonia, Thielaviopsis* y *Cylindrocladium*
	T-22 HC	*Trichoderma harzianum*	Tratamiento de semillas y control de enfermedades en la raíz
	PlantShield HC	*Trichoderma harzianum*	Control de enfermedades radiculares y foliares
	Cease	*Bacillus subtilis*	Control de enfermedades foliares
	Mycotrol O	*Beauveria bassiana*	Control de etapas larvarias de mosca blanca, trips, áfidos, escarabajos, insectos y gorgojos
	Molt-X	Azaridactina	Protege el follaje y el suelo de diversas plagas
	NemaShield Beneficial	*Steinernema feltiae*	Control de hongos, mosquitos y trips en flores

(Continúa)

(Continuación tabla 16.2)

Compañía	Productos	Agentes activos	Actividad biológica
Koppert B. V. Holanda	Mycotal	*Lecanicillium muscarium*	Control de mosca blanca
	Aphidalia	*Adalia bipunctata*	Control de pulgones en todos los estadíos
	Capsanen	*Steinernema carpocapsae*	Control de larvas de las familias de Noctuidae, Pyralidae y Tipulidae
	Delphibug	*Delphastus catalinae*	Control de mosca blanca en invernadero
	Enermix	*Encarsia formosa* + *Eretmocerus eremicus*	Control de mosca blanca en invernadero
	Larvanem	*Heterorhabditis bacteriophora*	Control de larvas de distintas especies de escarabajo como el gorgojo de la vid
	Minusa	*Dacnusa sibirica*	Control de Minadores en todos los estadios larvarios
	Spical	*Neoseiulus californicus*	Control de arañas rojas
W. Neudorff Gmbh KG. Alemania	Pyrol	Piretrinas de Pyrol y aceite de canola	Control de insectos en jardines, invernaderos, plantas ornamentales al aire libre, huertos, frutas, bayas, y plantas de cítricos
	Vegol Canola Oil	Aceite de canola	Control de insectos y ácaros en frutas, flores y vegetales
	Neudosan	Sales de potasio de ácidos grasos	Control de insectos en vegetales, frutas y nueces, cítricos, bayas, ornamentales, arbustos, flores y árboles en hogares, jardines e invernaderos
	Neudorff Bug Bait	Spinosad	Control de insectos
	SPy Sulfuro y piretrinas	Azufre y piretrinas	Control de insectos, enfermedades y ácaros en flores, plantas de interior, árboles y arbustos ornamentales, frutas, nueces y vegetales.
Valent Biosciences Corporation. Estados Unidos	DiPel	*Bacillus thuringiensis*	Control de lepidópteros en vegetales, frutas, nueces, vides y otros cultivos
	XenTari B	*Bacillus thuringiensis*	Control de *Spodoptera* spp. y *Plutella xylostella* en verduras, frutas, nueces, y césped
	Biobit	*Bacillus thuringiensis*	Control de gusanos en verduras
	Novodor	*Bacillus thuringiensis*	Control de coleópteros
	VectoBac	*Bacillus thuringiensis*	Control de larvas de mosquitos y mosca negra
	VectoLex	*Bacillus sphaericus*	Control de mosquitos
	Teknar	*Bacillus thuringiensis*	Control de larvas de mosquitos y mosca negra
	Gnatrol	*Bacillus thuringiensis*	Control de larvas de mosquitos
	Gnatrol DG	*Bacillus thuringiensis*	Control de larvas de mosquitos y mosca negra
	Foray	*Bacillus thuringiensis*	Control de lepidópteros
	Thuricide	*Bacillus thuringiensis*	Control de larvas de polillas y gusanos que comen hojas
	DiTera	*Myrothecium verrucaria*	Control de nematodos en uvas, piñas, nueces, frutas, cítricos y vegetales

(Continúa)

(Continuación tabla 16.2)

Compañía	Productos	Agentes activos	Actividad biológica
Certis USA L.L.C. Estados Unidos	Agree WG	*Bacillus thuringiensis* subespecie *aizawai*	Control de lepidópteros
	CoStar	*Bacillus thuringiensis* subespecie *kurstaki*	Control de larvas
	Crymax WDG	*Bacillus thuringiensis* subespecie *kurstaki*	Control de larvas
	Deliver	*Bacillus thuringiensis* subespecie *kurstaki*	Control de lepidópteros
	Javelin WG	*Bacillus thuringiensis* subespecie *kurstaki*	Control de lombrices
	Lepinox WDG	Bacillus *thuringiensis* subespecie *kurstaki*	Control del gusano cogollero
	PFR-97	*Isaria fumosorosea*	Control de mosca blanca, áfidos, trips y araña roja
	DES-X	Ácidos grasos	Control de áfidos, chinches, arañas rojas y psílidos
	Double Nickel 55	*Bacillus amyloliquefaciens*	Control de enfermedades fúngicas y bacterianas de las plantas

Fuente: Elaboración propia con base en Markets and Markets (2017)

Dinámica del mercado de agentes de biocontrol

El mercado de agentes de control biológico ha tenido una dinámica especial en los últimos años. Sin embargo, aún persisten varios factores que se deben considerar para la implementación de los productos que se desarrollen. A continuación, se describen los mencionados por Ravensberg (2011) y otros que recogen la experiencia y visión de los autores.

Factores críticos que se deberían tener en cuenta para generar un nuevo producto de biocontrol para el mercado

En la mayoría de los casos, la decisión para desarrollar un nuevo producto debe basarse en el mercado. Hay un problema de plagas que pide una solución, pero es necesario analizar qué tan grande es ese mercado y cuánto está dispuesto el productor a gastar para resolver el problema de la plaga. La decisión del nuevo desarrollo también podría depender de cuán novedosa es la idea de investigación que puede llegar a transformarse en un producto valioso con una buena oportunidad de penetrar en un mercado existente debido a su carácter innovador. Dentro de los factores clave que determinan cuándo el negocio del biocontrol puede ser rentable está la necesidad del mercado y su tamaño, así como la competitividad, el costo, el precio y el tiempo requerido para llegar a tener una disponibilidad de volumen comercial.

Demanda del mercado

El desarrollo de un bioproducto se debería generar a partir de una demanda para solucionar una cierta plaga o enfermedad. Una confirmación del mercado por

parte de la demanda sería la situación ideal, pero esto raramente sucede. Cuando la necesidad del bioplaguicida se proyecta para el futuro, la decisión será incierta. Por otro lado, cuando se necesita una solución específica, la situación puede haber cambiado una vez el producto previsto esté listo para ser lanzado, lo que lleva muchos años y, mientras tanto, otras soluciones pueden llegar al mercado. La demanda del mercado puede ser generada por varios factores: la aparición de una nueva plaga, la falta de plaguicidas para su control, la resistencia a los plaguicidas disponibles en el mercado y la retirada de los plaguicidas existentes. Estos factores están directamente relacionados con la plaga, aunque existen otros factores sociales indirectos que también pueden generar una demanda del mercado, como las preocupaciones por el medio ambiente y por la salud humana.

Tamaño de mercado

Los bioplaguicidas siguen siendo productos de nicho. El tamaño del mercado se determina por la importancia de la plaga, el número de cultivos en los que la plaga es un problema serio y la extensión de dichos cultivos. Para lograr una estimación acertada sobre el tamaño de mercado objetivo se debe estudiar este en términos de hectáreas, número de temporadas para cultivar, competencia y costos de aplicación.

Costo del agente de biocontrol y precio de venta

Tanto el costo como el precio de venta del agente de biocontrol determinan si el producto puede ser vendido de una manera rentable. El precio de venta depende de la demanda del producto en el mercado y del precio de otras medidas de control de la competencia. El precio del producto es a menudo alto en los primeros años después de su lanzamiento, con el fin de obtener el retorno de la inversión en un corto período. Posteriormente, el precio puede ser menor, debido a la competencia y con el fin de ampliar el área de uso. Muchos de los bioplaguicidas que están en el mercado se utilizan en cultivos de alto valor con superficies limitadas. Estos cultivos permiten a los productores gastar más dinero por unidad de área y, por lo tanto, ofrecen un nicho de mercado interesante para los bioplaguicidas.

Lamentablemente, las otras propiedades favorables de los productos de control biológico, tales como seguridad para el ser humano, carencia de residualidad, seguridad con el medio ambiente, etc., son difíciles de explotar en un precio de venta. La competencia se basa principalmente en factores tradicionales como la eficacia y los costos.

Tiempo que comprende el desarrollo y la llegada al mercado

Tanto el tiempo del desarrollo de un producto como el tiempo de registro deben ser estimados con la mayor exactitud posible. La primera variable está en manos del grupo de investigación o el fabricante, y se puede hacer una estimación (4-6 años), mientras que la segunda depende de las autoridades reguladoras, pero las predicciones han resultado muy difíciles de hacer. En general, el registro del ingrediente activo toma más de cinco años en Europa y muchos años más para obtener autorizaciones nacionales que abran el mercado, mientras que en EE. UU. toma dos años aproximadamente, y en Colombia tarda de uno a dos años.

Fortalezas y debilidades de los productos de biocontrol

Existe una lista de factores que determinan el éxito o fracaso de un producto de biocontrol. La lista de debilidades de los biocontroladores no puede ser ignorada y, principalmente por esta razón, su uso está restringido en la actualidad a nichos de mercado específicos. Sin embargo, algunas debilidades pueden convertirse en fortalezas; por ejemplo, un producto con un espectro de acción pequeño hace que sea seguro frente a los enemigos naturales que se encuentren en el cultivo (Chandler et al., 2011; Glare & Moran-Diez, 2016; Malik, 2015; Van Lenteren et al., 2017). A continuación, se exponen las principales fortalezas y debilidades de los productos de biocontrol:

Fortalezas:

- Productos con un mecanismo de acción sobre un grupo específico de huéspedes.
- Excelente herramienta para incorporarse en un MIP.
- Compatible con otros agentes de biocontrol, enemigos naturales y polinizadores.
- Herramienta aprobada en producción orgánica.
- Herramienta que no genera resistencia.
- Productos que no representan un peligro para el hombre y el medio ambiente.
- Productos que no generan residuos de agroquímicos de acuerdo con los "límites máximos de residuos" aceptados en los cultivos.
- Período de carencia más corto antes de la cosecha.

Debilidades:

- Eficacia moderada y variable dependiendo del medio ambiente.
- Espectro objetivo estrecho.
- Velocidad de acción lenta.
- Productos sensibles a factores abióticos e incompatibles con algunos agroquímicos.
- Estabilidad de almacenamiento limitada. En la mayoría de los casos se requiere refrigeración.
- Tecnología de aplicación más complicada en algunos casos.
- Productos intensivos en conocimiento que demandan transferencia de *know-how*.

Tendencias en el mercado de alimentos que favorecen el uso y venta de los agentes de control biológico

Según datos de la FAO publicados en el 2012, para el 2050 la producción mundial de alimentos deberá aumentarse en un 60 % para satisfacer la demanda (Alexandratos & Bruinsma, 2012). A sabiendas de que la mayoría de tierras cultivables ya están siendo explotadas, este incremento tendrá que venir con un aumento en la productividad (The Economist, 2016). Este aumento masivo en la producción de alimentos y el cambio climático pueden exacerbar el daño en los cultivos por causa de plagas y enfermedades, siendo cada vez más necesario el uso de agroquímicos para su control. No obstante, en la actualidad se ven cambios en las regulaciones y en las percepciones políticas, culturales y sociales que crean una demanda creciente de nuevas herramientas como el uso de agentes de control biológico (Dunham & Dunham, 2015).

Uno de los resultados de una regulación más estricta en la Unión Europea es que el número de plaguicidas cuyo uso está permitido ha pasado de 1.000, a comienzos de la década de los noventas, a 400 en la actualidad (The Economist, 2017). Las tendencias en el mercado de alimentos limpios han aumentado la demanda en el uso de estas nuevas tecnologías, principalmente por los siguientes factores:

- Demanda de fuentes de producción alimenticia segura y sostenible.
- Fuerte enfoque en la calidad de los alimentos y salud nutricional, incluyendo la creciente demanda de productos alimenticios con un mínimo de residuos de químicos.
- Incremento de la demanda global de mercados por producción fresca.
- Incremento de regulaciones y requisitos de registro para productos fitosanitarios, que conllevan al retiro de ciertas moléculas químicas del mercado.
- Pequeños agricultores esperan una producción agrícola sostenible.
- Importante crecimiento en el número de asociaciones a lo largo de la cadena de valor de los alimentos.
- Crecimiento de agricultura sostenible y de los programas de MIP.
- Aumento de mercados en los que el uso de productos químicos está prohibido o restringido (silvicultura, hogar, jardines, parques naturales, etc.) (Malik, 2015; Ravensberg, 2015).

Jalonadores del mercado

El desarrollo del mercado de los bioplaguicidas se ve influenciado por muchos factores, pero hay algunos que favorecen en mayor proporción el aumento de las ventas. A continuación, se exponen algunos de los jalonadores considerados por diferentes autores o expuestos en diferentes reuniones o seminarios en donde se analiza las perspectivas de crecimiento de este nuevo mercado (Dunham & Dunham, 2015; Malik, 2015; Olson, 2015; Van Lenteren et al., 2017).

Mejoras en la producción

En la mayoría de las evaluaciones de campo realizadas durante el desarrollo de un bioproducto, se determinan parámetros de incidencia, severidad, mortalidad, eficacia, etc.; sin embargo, el productor espera ver estos resultados asociados a su producción y a la calidad de su cosecha. Es necesario incorporar en las evaluaciones de campo estos elementos de valor que le permitan ver fácilmente al cliente si el producto de biocontrol le garantiza mínimo la misma productividad que mantenía con las otras estrategias de control.

Relación costo-efectividad

El productor espera un buen resultado en términos de eficacia, teniendo en cuenta el precio que pagó por el bioinsumo. La comprensión de las limitaciones financieras del cliente también es importante. Algunas formulaciones que están disponibles no pueden comercializarse debido a sus altos costos. Los agricultores con un cultivo de alto valor pueden optar por formulaciones más caras que los que tienen grandes áreas cultivadas con un cultivo de bajo valor económico.

Control duradero

En algunos bioproductos se debe asegurar que el mecanismo de acción del biocontrolador no tarde tantos días en desarrollarse y, además, que sea sostenido en el tiempo.

Seguridad del medio ambiente

Algunas razones por las que los agentes de biocontrol, después de muchos años de investigación, no se convierten en productos es porque en algunas ocasiones los grupos de investigación sobreestiman el poder de las preocupaciones medioambientales como motores económicos. Es necesario tener conocimientos suficientes sobre las necesidades reales de los productores, la fuerza competitiva de otras estrategias de control, la estrategia de registro, el posible posicionamiento y la estrategia de mercado del futuro desarrollo.

Costos asociados al desarrollo de una molécula sintética vs. bioplaguicidas

Los costos asociados al desarrollo de un producto de síntesis química en el 2010 fueron reportados en US$256 millones (Glare et al., 2012), pero para el 2017 se estiman en US$500 millones, requiriendo alrededor de 10 años de investigación. El número de compuestos potenciales a probar para cada nueva sustancia se ha elevado de 50.000 a 140.000 (The Economist, 2017). Para el caso de los productos biológicos, se pueden requerir US$10 millones y su desarrollo puede realizarse entre 4 y 6 años (Olson, 2015). Teniendo en cuenta la amplia experiencia de más de 20 años en desarrollo de bioplaguicidas que tiene la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica), se puede concluir que, en el caso de realizar la investigación continuada en el tiempo, un desarrollo puede tardar entre cuatro a cinco años y costar de US$1 millón a US$3 millones.

Presión regulatoria y cambios en las políticas

El cambio en las políticas y reglamentaciones favorece el uso de agentes de control biológico. Por ejemplo, la Unión Europea fomentó el uso de agentes de control biológico desde el 2009 (Parlamento de la Unión Europea, 2009), y más recientemente el presidente de China lanzó un programa nacional de investigación para la reducción de insecticidas químicos y fertilizantes con un presupuesto de US$340 millones (Van Lenteren et al., 2017).

Barreras del mercado

El control biológico es considerado uno de los componentes fundamentales del manejo integrado de plagas; sin embargo, aún persisten diferentes factores que han dificultado su posicionamiento en el mercado, los cuales se describen a continuación.

Carencia de información y promoción

Aunque el número de agentes de biocontrol registrados ha aumentado en los últimos años, solo una pequeña proporción de los aislamientos que se evalúan tienen éxito en campo, debido a aspectos técnicos como la falta de conocimiento del sistema de control biológico y a la dificultad en la obtención de una formulación exitosa (Emmert y Handelsman, 1999). Sin embargo, el escaso éxito también se debe al poco conocimiento de estos bioproductos a nivel comercial. Es necesario realizar una campaña eficiente de promoción que incluya el conocimiento de la investigación que respalda el desarrollo y garantice su credibilidad (Malik, 2015).

Baja eficacia

La honestidad al promover las ventajas y eficacia esperada del producto es muy importante; prometer acciones que no se presentarán en un futuro es contraproducente para garantizar una venta constante de este. Los usuarios pueden decidir usar un bioplaguicida por un número de razones; sin embargo, los costos y la eficacia siguen siendo las características más importantes para la decisión de un productor. Es necesario evaluar el agente de control biológico en grandes extensiones y en varias cosechas para garantizar el efecto real del producto (Malik, 2015).

Costo de aplicación del biocontrolador

La comprensión de las necesidades del cliente también es un factor clave para que el bioplaguicida desarrollado tenga éxito comercial. La aplicación debe encajar dentro del manejo convencional de los agricultores y debe ser compatible con la maquinaria comúnmente utilizada. La aceptación del mercado será lenta si se requiere equipo especializado y costoso (Bailey, Boyetchko, & Längle, 2010).

Carencia de pruebas de eficacia en grandea áreas

Durante el desarrollo del bioproducto se suelen realizan muchas evaluaciones *in vitro* o en condiciones contraladas de invernadero, y algunas bajo condiciones de campo. Es necesario incorporar al final del desarrollo una validación en parcelas semi o comerciales en varios años consecutivos y en zonas agroecológicas diferentes, que le brinden confianza al cliente sobre la nueva alternativa de control que le están ofreciendo (Malik, 2015).

Acción lenta

Entender cómo funciona el agente de biocontrol puede facilitar la optimización del control y ayudar a la detección de cepas más eficientes. Los mecanismos de acción de algunos agentes de biocontrol se deben conocer en detalle; además, una comprensión más profunda de la ecología puede ayudar a definir los problemas que se podrían presentar, cómo abordarlos, cuándo y dónde aplicar el agente de control biológico y, así, predecir situaciones en las que no se espera que el control funcione.

Falta de disponibilidad del producto

Una vez que el bioproducto ha sido registrado, las ventas pueden comenzar, para lo cual es necesario que el sistema de manufactura del agente de biocontrol ya se encuentre en una fase de industrialización para suplir la demanda (Malik, 2015).

Falta de conocimiento por parte de los agricultores

La adopción de los bioplaguicidas en el mercado es un proceso lento. Su utilización se recibe con cierto

escepticismo y tiende a incorporarse en el manejo de los cultivos poco a poco, por lo que el aumento de las ventas no viene de la noche a la mañana y requiere de tiempo y esfuerzo considerables. Los bioplaguicidas tienen que conquistar su posición en el mercado y justificar su lugar. Se debe considerar que los plaguicidas químicos siguen siendo la principal competencia debido al precio, facilidad de uso y eficacia, así como también debido a la rutina del productor. Los usuarios deben estar convencidos de que un nuevo producto logra resultados similares en sus prácticas habituales. Es esencial entender la competencia y desarrollar formas de posicionamiento del biocontrolador como un sustituto o como un producto alternativo, para lo cual se requiere demostraciones en campo, mayor educación y más ensayos comparativos con otras alternativas de control.

Inestabilidad de los principios activos en condiciones ambientales

Una crítica frecuente del control biológico es que el grado de control puede diferir dependiendo del medio ambiente. A menos que se esté desarrollando el control para un sistema con un entorno relativamente constante, es importante determinar hasta qué punto la temperatura, la luz solar, la humedad, el tipo de suelo, el cultivo y otros factores afectan el desempeño del agente de biocontrol. Por otra parte, el sistema de envasado puede ayudar a mejorar la viabilidad mediante la limitación de la exposición de la formulación a las fluctuaciones de humedad y oxígeno; sin embargo, el mayor reto está en el diseño de la formulación (Schisler, Slininger, Behle, & Jackson, 2004). Además, la gran variedad de condiciones de almacenamiento para la distribución, incluyendo los canales seleccionados, puede también limitar la penetración en el mercado del bioplaguicida.

Incompatibilidad en tanques de mezcla

La mayoría de agentes de control biológico microbianos (hongos y bacterias) son incompatibles con fungicidas e insecticidas, mientras que los virus y extractos botánicos en general pueden ser mezclados con algunos agroquímicos que comúnmente se usan.

Procesos de registro con enfoque de agroquímicos

En algunas ocasiones se subestiman los tiempos y costos de registro, así como las dificultades de estos procesos en término de requisitos de toxicología y ecotoxicología que se exigen en algunos países, cuya reglamentación para el registro de agentes de biocontrol se mantiene unida a la de agroquímicos (Chandler et al., 2011). Este tema se amplía en el capítulo 15 de este libro, bajo el título de "Marco regulatorio para el registro de bioplaguicidas".

Nuevos plaguicidas químicos más seguros

En los últimos años, la investigación sobre las aplicaciones de la nanotecnología se ha vuelto cada vez más popular, especialmente en el desarrollo de nuevas nanoformulaciones de agroquímicos. Esto nuevos desarrollos se enfocan principalmente en hacer que los ingredientes activos (IA) con limitada solubilidad en agua se dispersen más fácilmente en el momento de la aplicación en el campo, así como en aumentar la posibilidad de utilizar insecticidas con IA menos tóxicos para los organismos no objetivo, en reducir el desarrollo de resistencia y en garantizar la estabilidad del IA, que son comúnmente inestables en el medio ambiente (Kah y Hofmann, 2014; Seiber, Coats, Duke, & Gross, 2014).

Escepticismo de los productores, basado en la expectativa del nivel de productos químicos

La posibilidad de producir una cosecha no comercializable lleva a los agricultores a evitar el riesgo con respecto a nuevas tecnologías de protección. Los plaguicidas convencionales han sido el pilar de la protección de cultivos durante más de 50 años, una riqueza de experiencia que da a los agricultores confianza en su eficacia. En comparación, el uso de estas nuevas tecnologías de control biológico no cuenta en algunos casos con experiencia en pruebas en grandes áreas y la experiencia práctica en tecnologías de MIP crea cierta

incertidumbre para los agricultores. Las preferencias y su aversión al riesgo pueden resultar en patrones negativos para la adopción de nuevas tecnologías. Por otra parte, debido a que los insecticidas y fungicidas químicos convencionales se utilizan tan ampliamente, los costos fijos asociados a ellos se distribuyen entre muchos usuarios y, por lo tanto, su uso representa una pequeña parte del costo total de control de plagas. Los bioplaguicidas se enfrentan a grandes costos fijos de adopción que solo disminuirá una vez que la tecnología se utilice más ampliamente (Chandler et al., 2011).

Mercado de nicho

Muchos bioplaguicidas tienen altos niveles de selectividad. Por ejemplo, los bioinsecticidas basados en baculovirus, tales como el granulovirus de *Cydia pomonella* (CpGV), son selectivos para un insecto y para pocas especies relacionadas. Esto es de gran beneficio en términos de no afectar a otros enemigos naturales y a la vida silvestre, pero también significa que los bioplaguicidas son productos de limitado nicho de mercado con bajo potencial de ganancia en algunos casos (Chandler et al., 2011).

Factores críticos en el proceso de comercialización de agentes de control biológico

El éxito comercial de un bioplaguicida depende de muchos factores relacionados con la naturaleza de la tecnología y con el mercado objetivo (Ravensberg, 2011).

Necesidad de un fuerte compromiso de la gerencia del proyecto

El desarrollo de un nuevo bioplaguicida es un desafío largo y costoso. Un proyecto total puede costar varios millones de dólares, y tomar en promedio de cinco a ocho años para llegar a un punto de equilibrio, e incluso más años para alcanzar un volumen de ventas que proporcione el beneficio deseado. La gerencia debe ser consciente de esto desde el principio. Hacer ganancias rápidas no es una característica estándar en este tipo de negocio, lo que ha llevado a muchos inversionistas a experimentar esta situación y a retirarse de este negocio.

Plan de negocios definido

Un requisito previo para la elaboración del proyecto de desarrollo de un nuevo bioplaguicida es un plan de negocios exacto con proyecciones de beneficios realistas. El cálculo de los ingresos potenciales de seis a diez años en el futuro es una tarea difícil y debe hacerse de manera conservadora. Los planes de negocio deben prever un bajo porcentaje de penetración del mercado, particularmente en los primeros años (1-5 %). El desarrollo de productos de biocontrol y los costos de registro conllevan altos costos y muchas empresas no se dan cuenta de esto. Los requerimientos y costos involucrados para la adopción del mercado y alcanzar el volumen de ventas son a menudo subestimados o incluso descuidados y muchas compañías han fracasado en esta fase. El tiempo y el dinero para el estudio del correcto posicionamiento del producto y la educación de los usuarios es a menudo un punto descuidado en los planes de negocio.

Un buen científico no es necesariamente un buen empresario

En los nuevos negocios, a menudo se cita la mala gestión como la principal razón del fracaso. En el caso de empresas tipo *spin-off* que se generan a partir de una organización de investigación, estas cuentan con todo el *know how* sobre el conocimiento técnico del bioproducto, pero es necesario también dar un gran énfasis e importancia a las habilidades de gestión y gerencia. Los propietarios de pequeñas empresas a menudo carecen de experiencia relevante en negocios y administración en áreas como finanzas, compras, ventas y producción. Todos estos aspectos son cruciales para la supervivencia y el éxito del negocio.

En el caso que sea una gran empresa la que entra en el campo de los bioplaguicidas, la gerencia no siempre entiende este tipo de negocio; por lo tanto, debe invertir tiempo suficiente para entender el campo del biocontrol. En general, el desarrollo de un

bioplaguicida requiere de un equipo multidisciplinario con suficiente conocimiento y experiencia en las áreas de investigación, producción, registro y comercialización.

Conocimiento profundo del mercado objetivo

El conocimiento profundo de la plaga objeto de control y del mercado potencial es elemental y parece obvio, pero muchas compañías han sobrestimado la potencial participación en este mercado y, como consecuencia, se han encontrado con un fracaso en las ventas. Las cifras sobre el daño causado por las plagas no se pueden transferir directamente al posible potencial de mercado. El poco conocimiento sobre las plagas, los clientes, los cultivos, las prácticas de control, los precios, la competencia y los requisitos para promover un nuevo producto pueden conducir a errores y, seguramente, a una lenta penetración en el mercado.

Modelos de negocios en la industria del biocontrol

Hasta hace algunos años, varios autores habían descrito tres modelos en el negocio del biocontrol. El primero es el modelo de propiedad de capital en el que el propietario invierte a un nivel limitado y el desarrollo es gradual (empresas pequeñas de biocontrol que se encargan del desarrollo y comercialización). El segundo tipo es el modelo de inversión social, en el que se realizan grandes inversiones antes de que se produzcan las ventas y el desarrollo puede ser rápido; por ejemplo, la inversión puede ser por organizaciones gubernamentales. El tercer modelo es el de inversión de capital de riesgo con niveles de inversión que superan en gran medida las ventas y los desarrollos son grandes y rápidos; en este modelo, la tecnología patentada es un requisito previo para proteger la inversión de la competencia (Friedman, 1990).

Hay un cuarto modelo que ha crecido ampliamente en los últimos años y es patrocinado por las multinacionales, que proyectaron los bioplaguicidas como una nueva oportunidad atractiva para obtener beneficios y decidieron establecer una unidad de negocio para desarrollar este potencial. Este modelo se puede separar en dos categorías: 1) las grandes empresas de agroquímicos que contemplan nuevos productos junto a sus productos químicos, que comprenden empresas que trabajan en los mercados agrícolas y forestales de gran extensión, lo que conlleva a una ampliación en el uso de productos de biocontrol hacia cultivos de grandes extensiones (Glare et al., 2016); 2) las grandes empresas farmacéuticas o alimenticias, nuevas en el área de protección de cultivos, que esperaban explotar su experiencia y tecnología en producción para el desarrollo de bioplaguicidas. Ejemplos del primer grupo son Bayer, Cyanamid, Monsanto y BASF, y ejemplos del segundo grupo son Tate & Lyle, Novo Nordisk y Abbott (CPL Business Consultants, 2010).

Este nuevo modelo de negocio se ha incrementado en los últimos cinco años. Es así como las principales empresas de plaguicidas de todo el mundo han adquirido pequeñas y medianas empresas de biocontrol o sus productos. Por ejemplo, en el 2012 y 2013, Bayer CropScience adquirió Agraquest (por US$425 millones) y Prophyta respectivamente. Por otra parte, en el 2012, BASF adquirió Becker Underwood, Koopert adquirió Itaforte Bioproducts, Syngenta adquirió Pasteuria y DevGen; asimismo, Monsanto adquirió a Rosetta Green. Luego, en el 2013, Monsanto y Novozymes establecieron un consorcio llamado BioAg, mientras que en el 2015 lo hicieron Syngenta y DSM. Por otra parte, DuPont compró Taxon Biosciences y recientemente Certis USA adquirió a LAM International (The Economist, 2016; Olson, 2015; Ravensberg, 2015).

Ejemplos de experiencias en el mercado del biocontrol

Son muchos los ejemplos tanto a nivel internacional como en Colombia sobre casos exitosos del mercado de los agentes de control biológico; a continuación, se describen a manera de ejemplo algunos de estos.

Brasil: Laboratorio Farroupilha Lallemand

Una de las principales compañías del control biológico en Brasil es el Laboratorio Farroupilha, fundado en

el 2006 y con una presencia en más del 80 % del territorio brasileño. Este laboratorio fue fundado con el objetivo de crear soluciones biológicas para la agricultura y reducir el uso de plaguicidas químicos, además de promover la producción de alimentos más saludables. Su portafolio inició con un producto a base de *Trichoderma asperellum* para controlar *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Sclerotinia*. Con el tiempo se desarrollaron otros productos dentro de su línea Biopotente, contando actualmente con siete bioplaguicidas y un inoculante, además de por lo menos tres en fase de registro (Laguardia, 2016).

En el 2015, la empresa canadiense Lallemand adquirió el Laboratorio de Farroupilha con el objetivo de fomentar el control biológico y crear una nueva plataforma de su división "Plant Care". La expansión del portafolio de productos es una de las primeras ventajas de esta alianza, teniendo en cuenta que entre las dos empresas tienen un portafolio que incluye biofungicidas, bioinsecticidas, bionematicidas y una línea de inoculantes que se fortalece con la adquisición por parte de Lallemand de la compañía uruguaya Lage y Cia. Otra de las ventajas es la mayor capacidad de investigación, ya que Lallemand cuenta con 142 PhD que manejan diferentes microrganismos, lo que facilita el intercambio de información para la mejora de procesos y formulaciones. Ahora Farroupilha puede acceder a mercados como Estados Unidos, México, América Latina y Europa. El plan estratégico para el Laboratorio Farroupilha Lallemand es el crecimiento de un 30 % por año asociado a la ampliación de portafolio y la inversión en la infraestructura de producción especialmente en formulaciones sólidas (WP y WG) (Trebilcock, 2016b).

Costa Rica: Uso de trampas de feromonas para el control de gorgojos de la palma

Los gorgojos de la palma de aceite, coco y palmito, de los géneros *Rhynchophorus* y *Dynamis*, han sido reconocidos como la plaga más perjudicial económicamente en palmas. Ahora se sabe que *Rhynchophorus palmarum* es el vector de la enfermedad conocida como el anillo rojo (RRD, por las siglas del término inglés *Red Ring Disease*), causada por el nemátodo *Bursaphelenchus cocophilus*, y que la reducción de la población de gorgojos es clave para reducir la infestación de nematodos. Las palmas infectadas con el nematodo desarrollan un anillo rojo necrótico que le da su nombre característico, con el que las altas poblaciones de nematodos cortan el flujo de nutrientes y producen la muerte de la palma (Chinchilla et al., 1990). Para su control, se han venido utilizando trampas con feromonas, logrando resultados satisfactorios sobre el retorno de la inversión que han hecho que las densidades de producción de palma aumenten.

El siguiente análisis muestra las bondades del control biológico en Costa Rica y se basa en los datos de Palma Tica, el mayor productor de palma aceitera de Costa Rica. Los costos de mantenimiento en el 2015 para una trampa con cebos en Palma Tica fueron 21,00 dólares/trampa/año (incluye feromonas, baldes y caña de azúcar), mientras que la mano de obra, combustible y servicios sociales fueron de 23,00 dólares/año. Una trampa se usa por cada 5 ha, es decir que corresponde a un costo de 9,00 dólares/ha/año. Utilizando esta densidad de trampas, se reduce la enfermedad del anillo rojo a menos de 1 palma/10 ha, comparado con pérdidas observadas en plantaciones en la ciudad de Coto, en donde la incidencia de la enfermedad fue más alta, requiriendo la eliminación de 34 palmas infectadas/10ha/año. Cada palma talada representa un sitio de producción perdido durante el tiempo restante del cultivo, que tiene ciclos de 25 a 30 años (Barcelos et al., 2015).

Las plantaciones de Costa Rica producen 3,8 toneladas métricas de crudo por hectárea (IndexMundi, 2016), es decir 26,7 kg/palma (utilizando la densidad de siembra en Coto de 142 palmas/ha) (Oehlschlager, Chinchilla, Castillo, & González, 2002). Los precios actuales del crudo del aceite de palma están cerca de US$565/tonelada métrica (IndexMundi, 2016), que corresponde a un rendimiento de US$15/palma/año. Con las densidades actuales de trampas en uso (1 trampa/5 ha), la captura deberá garantizar la reducción de palmas infectadas por RRD a 10 palma/10 ha/año para que sea una inversión viable. Dado que actualmente el control con trampas reduce las pérdidas a 1 palma/10 ha/año, este método se considera rentable.

Otra manera de analizar los aspectos económicos de la captura con trampas con feromonas es examinar la

experiencia en una gran plantación en Coto. En 1991, hubo 22.097 palmas cortadas por RRD. Suponiendo que la edad promedio de las palmas retiradas sea de 20 años, esto representa una pérdida de un mínimo de cinco años de producción por cada palma retirada, que equivale aproximadamente a US$1.455.000 (precios de 2015). Después de tres años utilizando trampas de feromona, este valor se redujo en un 88 % (en promedio), con un costo adicional de US$129.000 (1.000 trampas durante el período de tres años). Aunque este cálculo no representa el número exacto de años de producción de palma ahorrada, el beneficio económico es claro.

Durante la ejecución del trabajo de Coto, la Comisión de Productores de Palma de Costa Rica y el Ministerio de Agricultura formularon una ley que obliga a los cultivadores de palma a tomar medidas contra la RRD (Ley de Protección Fitosantaria 7664, Decreto 27043-MAG). La aplicación de esta Ley se centra en la captura de los insectos. Aunque esto parece una invitación abierta a usar trampas de feromonas, en el continente americano, salvo Canadá y los Estados Unidos, se requiere del registro de todas las feromonas independientemente de su uso. El registro requiere ensayos de eficacia en cada país, financiados por el solicitante de registro. En los Estados Unidos las feromonas utilizadas en las trampas para el monitoreo no requieren registro. Desde el desarrollo de la captura masiva con feromonas para *R. palmarum* (1993), el área cultivada de palma aceitera en América Central aumentó de 31.000 ha a 340.000 ha (~11 %/año), y en Sudamérica de 261.000 ha a 761.000 ha (~4,8 %/año) (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos [USDA], 2016). El número de señuelos de feromonas consumidos en Centroamérica se ha mantenido aproximadamente al ritmo de la expansión del área cultivada de palma aceitera en esta región.

Colombia: AGROSAVIA

AGROSAVIA cuenta con una experiencia de más de 20 años en el desarrollo de productos a base de microorganismos y ha licenciado tecnologías de formulación de biofungicidas a empresas extranjeras como el Laboratorio Farroupilha de Brasil, en el 2007, y Prophyta de Alemania, en el 2008. Actualmente, cuenta con dos biofertilizantes fijadores de nitrógeno registrados ante el ICA: 1) Monibac (Resolución 9437), a base de la bacteria *Azotobacter chroococcum*, cepas AC1 y AC10, para su uso en los cultivos de algodón y gramíneas; 2) Rhizobiol (Resolución 9354), a base de la bacteria *Bradyrhizobium japonicum*, cepas J01 y J96, para su uso en soya.

AGROSAVIA también cuenta con tres bioplaguicidas registrados: 1) Baculovirus Corpoica (Resolución 9354), a base del granulovirus de *Phthorimaea operculella*, para el control de *Tecia solanivora* en papa en almacenamiento; 2) Tricotec (Resolución 10150), a base del hongo antagonista *Trichoderma koningiopsis*, cepa Th003, para el control de patógenos radiculares en tomate, lechuga y arroz; y 3) Lecabiol (Resolución 10312), a base del hongo entomopatógeno *Lecanicillium lecanii*, cepa VL026, para el control de la mosca blanca.

Asimismo, AGROSAVIA cuenta dentro de sus redes de investigación con profesionales en microbiología, biología, ingeniería agronómica, entomología, fitopatología, bioquímica, microbiología molecular y fitoprotección. Junto a este equipo de investigadores está el Departamento de Bioproductos, que cuenta con profesionales de ingeniería química, química farmacéutica y microbiología, que trabajan conjuntamente en el diseño, desarrollo, escalamiento a nivel piloto y el registro de los Bioproductos. Además, AGROSAVIA ha creado alianzas estratégicas con laboratorios e industrias biotecnológicas de primera línea a nivel nacional e internacional que permiten el escalamiento industrial de sus bioproductos y la integración de estos en el mercado. Las líneas de trabajo en el desarrollo de bioproductos son tanto bioplaguicidas, como inoculantes y bioproductos para salud animal. Actualmente, se tiene una alianza a nivel nacional con una empresa nacional para la producción de un inoculante, y a nivel internacional se están realizando alianzas con grandes empresas reconocidas en el mercado del biocontrol.

Perspectivas de la industria del biocontrol

La industria de los bioplaguicidas está íntimamente ligada a la industria agroquímica. En el 2015, el mercado global de agroquímicos se estimó en US$214,2 billones,

con una tasa de crecimiento anual compuesta proyectada en 3,2 %, entre el 2015 y el 2020 (Glare et al., 2012). No obstante, el crecimiento real del mercado estuvo por debajo de las expectativas del sector, alcanzando apenas un 2 %, frente a crecimientos anuales del 6 y 7 % en la década del 2000 (The Economist, 2017). La presión de los accionistas ha desatado una ola de megafusiones que, colectivamente, alcanzarán un valor estimado de unos US$240 billones en 2017.

Uno de los factores críticos en el desempeño de las compañías de agroquímicos se encuentra en la composición de su portafolio de productos. Para el 2011, los productos genéricos representaron el 51 % de las ventas con productos introducidos entre 1950 y 1979, los post-patente (productos cuyas patentes han caducado, pero no se producen masivamente a nivel de genéricos) representaron el 25,3 %, con productos introducidos entre 1980 y 1996, y los propietarios (cuyas patentes aún se encontraban vigentes) representaron el 23 %, con productos introducidos entre 1997 y 2011 (PhillipsMcDougall, 2012). Los márgenes de productos genéricos son significativamente menores a los de los productos post-patente y propietarios, lo que ejerce presión sobre las utilidades y el retorno a los accionistas.

A esta situación se suma que entre el 2000 y el 2009 se introdujeron 103 nuevos productos al mercado, mientras que en el período 2010-2012 se introdujeron 22, con una tasa esperada de introducción de 5,6 productos al año (PhillipsMcDougall, 2013).

En contraste, la industria de bioplaguicidas ha tenido un crecimiento constante entre el 2009 y el 2015, con tasas aproximadas del 15 % (Glare et al., 2012). Se proyecta que este crecimiento continúe por lo menos hasta el 2020, siendo un sector que representa aún un tamaño de mercado pequeño, pero con una de las mayores perspectivas de crecimiento entre todos los subsectores de los agronegocios (figura 16.1) (Goedde et al., 2015). Los autores identificaron el sector de bioplaguicidas con tasas de crecimiento similares a las de otros autores (15 %) y con una tasa de riesgo (evaluada conjuntamente entre el riesgo geopolítico, regulatorio, de mercado y tecnológico) moderada. En el entorno económico global la industria de bioplaguicidas es más atractiva para los inversionistas que la agricultura de precisión, acuacultura, alimentos funcionales, entre otros sectores. El sector incluso goza de una posición de ventaja frente a las semillas modificadas genéticamente, dado el riesgo regulatorio que implican y su baja adopción en Europa. Algunos autores consideran que el mercado de bioplaguicidas superará el de agroquímicos convencionales hacia el 2050 (Olson, 2015); sin embargo, estas predicciones contienen márgenes de error muy significativos.

En el 2017, Adner y Kapoor propusieron una metodología de análisis a fin de entender la dinámica de adopción de una tecnología basada en cuatro cuadrantes determinados en el eje *Y*, por la magnitud en la que esta nueva tecnología amenaza el ecosistema tecnológico actual, y en el eje *X*, por la oportunidad de extender el actual modelo de negocio (Adner y Kapoor, 2017). Según estos autores, el 48 % de la variación en la velocidad de sustitución de tecnologías se puede atribuir a factores tradicionales, como el precio y los competidores en el mercado. Cuando se tiene en consideración la dinámica del ecosistema tecnológico, se puede explicar el 82 % de la variación (figura 16.2).

Al aplicar el marco de referencia sugerido por los autores, se encuentra que los bioplaguicidas podrían incluirse en cada uno de los ejes:

- **Amenaza al ecosistema tecnológico actual:** los bioplaguicidas se pueden considerar en un nivel bajo de amenaza, dado que la adopción masiva de la tecnología no requiere cambios en el ecosistema tecnológico, funciona con los mismos métodos de diagnóstico y aplicación, y es evaluada por parámetros de eficiencia de control similares. Adicionalmente, las redes de distribución y logística no requieren cambios sustanciales para alcanzar a los clientes finales.
- **Oportunidad de extensión del modelo de negocio actual:** se puede considerar un nivel de oportunidad muy alto, dado que en un escenario de bajo crecimiento y baja introducción de ingredientes activos nuevos, estas alternativas caracterizadas por su inocuidad, bajo nivel de riesgo de desarrollo de resistencia y una compatibilidad creciente con el portafolio de agroquímicos son ideales para ser integradas en el portafolio actual, generando buenos niveles de crecimiento, y tomando provecho de la enorme capacidad de mercadeo y posicionamiento de estas compañías.

Estas condiciones ubican la industria de bioplaguicidas en un escenario de coexistencia robusta con la industria del control químico, en el que la sustitución es lenta y las nuevas opciones de tecnología comparten las capacidades instaladas del sistema: producción, mercadeo, operaciones, venta y posventa. En este escenario, la nueva tecnología penetra lentamente el mercado, mientras que las compañías dominantes siguen en capacidad de defender su participación.

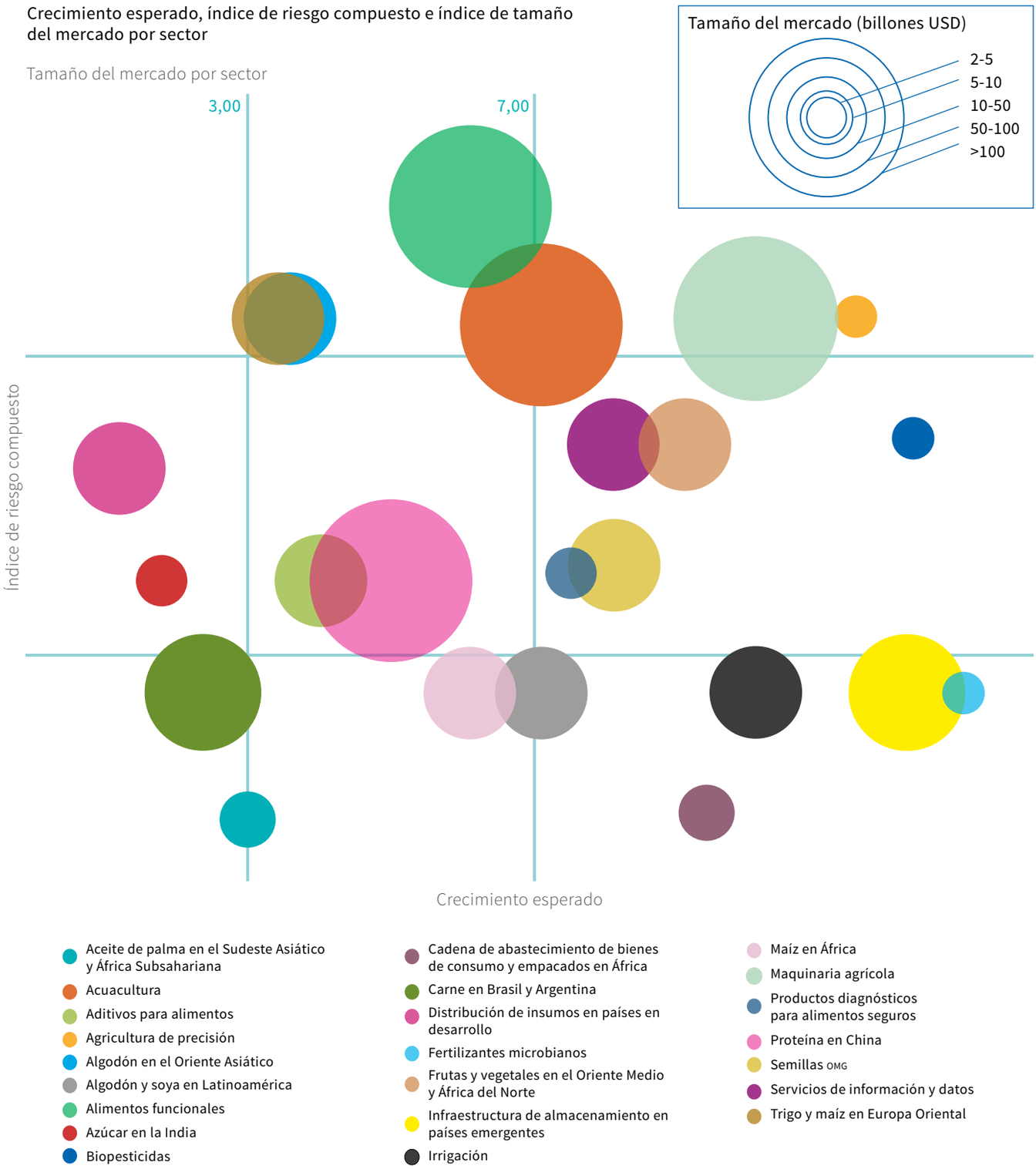


Figura 16.1. Matriz de oportunidades en el sector de agronegocios.

Fuente: Adaptada de Goedde, Horil y Sanghvi (2015)

Figura 16.2. Marco para analizar el ritmo de la sustitución tecnológica.

Fuente: Adaptada de Adner y Kapoor (2017)

Conclusiones

La industria de bioplaguicidas ha tenido un crecimiento constante entre el 2009 y el 2015, con tasas aproximadas del 15 %, y se proyecta que este crecimiento continúe, siendo un sector que presenta aún un tamaño de mercado pequeño, pero con una de las mayores perspectivas de crecimiento entre todos los subsectores de los agronegocios. Este hecho ha resultado en un nuevo modelo de negocio, en el que las grandes empresas de agroquímicos entran al negocio de biocontrol, generando nuevos productos para venderlos junto con sus agroquímicos. Por lo tanto, la demanda de nuevos productos a base de agentes de biocontrol ofrece una variedad de oportunidades para el desarrollo de estos nuevos mercados. Sin embargo, la generación de productos de biocontrol exitosos, que se conviertan en un producto rentable en el mercado, es un enorme desafío, y su comercialización requiere tanto de experiencia técnica, como de inteligencia empresarial y de la comprensión del mercado. A pesar de que existen diferentes factores que favorecen o limitan el desarrollo del mercado de bioplaguicidas, sigue siendo claro que el cliente final reconoce ciertos factores que influyen en la adopción final de estos productos y su éxito se basa básicamente en su eficacia, estabilidad, facilidad de uso, demostración de la rentabilidad sobre la inversión y costo.

Probablemente la tendencia de compras en el sector de bioplaguicidas continúe a la par de las megafusiones, generando un sector integrado en el que el productor final se vea beneficiado por la entrada al mercado de las nuevas alternativas de control, provistas por el mercado de bioplaguicidas, como por la mejora en las características de los agroquímicos en uso, impuestas por los nuevos requerimientos del mercado.

Referencias

Adner, R. & Kapoor, R. (2017). Right tech, wrong time. IEEE *Engineering Management Review, 45*(4), 81-85. doi:10.1109/EMR.2017.8233298.

AgroNews. (2017). *Global beneficial insects market to reach $788 million by 2022*. Recuperado de http://news.agropages.com/News/NewsDetail---21937.htm.

Alexandratos, N. & Bruinsma, J. (2012). *World Agriculture Towards 2030/2050: the 2012 revision*. Recuperado de http://www.fao.org/docrep/016/ap106e/ap106e.pdf.

Bailey, K., Boyetchko, S., & Längle, T. (2010). Social and economic drivers shaping the future of biological control: a Canadian perspective on the factors affecting the development and use of microbial biopesticides. *Biological Control, 52*(3), 221-229. doi:10.1016/j.biocontrol.2009.05.003.

Barcelos, E., de Almeida Rios, S., Cunha, R. N., Lopes, R., Motoike, S. Y., Babiychuk, E., … Kushnir, S. (2015). Oil palm natural diversity and the potential for yield improvement. *Frontiers in Plant Science, 6*, 190. doi:10.3389/fpls.2015.00190.

Biopesticide Industry Alliance (BPIA). (2014). *Biopesticides Offer Multiple Benefits for Agricultural Dealers and Consultants*. Recuperado de http://www.bpia.org/wp-content/uploads/2014/01/dealer_consultant-final.pdf.

Biopesticide Industry Alliance (BPIA). (2017). *Microbial biopesticides*. Recuperado de http://www.bpia.org/microbial-biopesticides/.

Agriculture and Agri-Food Canada. (2013). *Directory of Biopesticides for Agricultural Crops in OECD Countries - Search Form*. Recuperado de https://www5.agr.gc.ca/MPDD-CPM/search-recherche.do?lang=eng.

Cotes, A. M. (2014). Control biológico de enfermedades de plantas en Colombia. En W. Bettiol, M. C. Rivera, P. Mondino, J. R. Montealegre, & Y. C. Colmenárez (Eds.), *Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe* (pp. 169-179). Montevideo, Uruguay: Universidad de la República.

CPL Business Consultants. (2010). *A how to do it guide to biopesticides*. Recuperado de http://www.cplconsult.com/wp-content/uploads/2013/03/Contents-of-The-How-to-do-it-Guide-to-Biopesticides-with-Historical-Examples.pdf.

Chandler, D., Bailey, A. S., Tatchell, G. M., Davidson, G., Greaves, J., & Grant, W. P. (2011). The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B. Biological Sciences, 366*(1573), 1987-1998. doi:10.1098/rstb.2010.0390.

Chinchilla, C. M., Arias, E., Menjívar, R. T., Serrano, C., Iraheta, C., Menjívar, V., … González, M. (1990). *Picudo de la palma y enfermedad del anillo rojo/hoja pequeña en una plantación comercial en Honduras*. Chapingo, México: Universidad Autónoma Chapingo.

Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). (2016). *Oilseed, Palm Central América*. Recuperado de http://www.agrochart.com/en/usda/section/16/oils/region/12/centralamerica/commodity/83/oil-palm/attribute/23/area-harvested/.

Dicklow, M. B. (2017). *Biofungicides*. Recuperado de https://ag.umass.edu/greenhouse-floriculture/fact-sheets/biofungicides

Dunham, W. & Dunham, T. (2015). Evolution and future of biocontrol. Ponencia presentada en *X Annual Biocontrol Industry Meeting* (ABIM), Basel, Switzerland.

Emmert, E. A. & Handelsman, J. (1999). Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology Letters, 171*(1), 1-9.

Friedman, M. J. (1990). Commercial production and development. En R. Gaugler & H. K. Kaya (Eds.), *Entomopathogenic nematodes in biological control* (pp. 153-172). Boca Raton, EE. UU: CRC Press.

Glare, T., Caradus, J., Gelernter, W., Jackson, T., Keyhani, N., Köhl, J., … Stewart, A., (2012). Have biopesticides come of age? *Trends in Biotechnology, 30*(5), 250-258. doi:10.1016/j.tibtech.2012.01.003.

Glare, T. R. & Moran-Diez, M. E. (2016). *Microbial-Based Biopesticides. Methods and Protocols*. Nueva York, EE. UU: Human Press. doi:10.1007/978-4339-6367-6.

Goedde, L., Horil, M., & Sanghvi, S. (2015). *Pursuing the global opportunity in food and agribusiness*. Recuperado de http://www.mckinsey.com/industries/chemicals/our-insights/pursuing-the-global-opportunity-in-food-and-agribusiness.

Grand View Research. (2017). *IPM pheromones market size worth $1.5 billion by 2025 | CAGR 12.5 %*. Recuperado de http://www.grandviewresearch.com/press-release/global-ipm-pheromones-market.

Himmel, P. (2013). *The Role of Biopesticides as Seed Treatments*. Recuperado de http://agrithority.com/wp/wp-content/uploads/2013/03/BiopesticidesRole-Himmel.pdf.

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2012). *Comercialización de bioinsumos, coadyuvantes y reguladores fisiológicos, 2012*. Recuperado de https://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Fertilizantes-y-Bio-insumos-Agricolas/Estadisticas/Comercializacion-bioinsumos-y-coadyuvantes-2012-UT.aspx.

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2017a). *Empresa bioinsumosdiciembre de 2017*. Recuperado de https://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Fertilizantes-y-Bio-insumos-Agricolas/Listado-de-Bioinsumos/2009/EMPRESAS-REGISTRADAS-BIOINSUMOS-JULIO-8-DE-2008.aspx.

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2017b). *Productos registrados bioinsumos*. Recuperado de https://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Fertilizantes-y-Bio-insumos-Agricolas/Listado-de-Bioinsumos/2009/PRODUCTOS-BIOINSUMOS-MAYO-13-DE-2008.aspx.

IndexMundi (2016). *Costa Rica palm oil production by year*. Recuperado de https://www.indexmundi.com/agriculture/?country=cr&commodity=palm-oil&graph=production.

Instituto para la Innovación Tecnológica en Agricultura (Intagri). (2017). Control de nematodos desde una perspectiva integral. En *Serie Fitosanidad* (pp. 224-235). Ciudad de México, México: Intagri.

Kah, M. & Hofmann, T. (2014). Nanopesticide research: current trends and future priorities. *Environment International, 63*, 224-235. doi:10.1016/j.envint.2013.11.015.

Laguardia, H. (2016). *Canadense Lallemand compra Laboratório Farroupilha em MG. O Tempo*. Recuperado de http://www.otempo.com.br/capa/economia/canadense-lallemand-compra-laborat %C3 %B3rio-farroupilha-em-mg-1.1221244.

Leng, P., Zhang, Z., Pan, G., & Zhao, M. (2011). Applications and development trends in biopesticides. *African Journal of Biotechnology, 10*(86), 19864-19873. doi:10.5897/AJBX11.009.

Malik, A. (2015). *Biologicals – A key element in Integrated Crop Solutions*. Documento presentado en Annual Biocontrol Industria Meeting ABIM. Basilea, Suiza.

Markets and Markets. (2017). *Biopesticides market global forecast to 2020*. Recuperado de http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/biopesticide.asp

MicroMarket Monitor. (2015). *Global Agriculture Biopesticides Market in Post Harvest Market*. Recuperado de http://www.micromarketmonitor.com/reports/agriculture-biopesticides-market-in-post-harvest-1249817645.html.

MicroMarket Monitor. (2017a). *Europe Biopesticides Market By Origin (Beneficial Insects, Microbial Pesticides, Biochemical Pesticide), Type (Bioherbicides, Biofungicides, Bioinsecticides, Bionematicides), Application, Crop Type, Formulation, Geography – Forecast to 2020*. Recuperado de http://www.micromarketmonitor.com/market/europe-biopesticides-1352685033.html.

MicroMarket Monitor. (2017b). *Asia-Pacific biopesticides market by source (microbial, biorational), by application (permanent crop, arable crop), by end-use (seed treatment, on farm, post-harvest), by sub-market, by formulation, by geography - analysis & forecast to 2019*. Recuperado de http://www.micromarketmonitor.com/pressreleases/asia-pacificbiopesticides.html.

MicroMarket Monitor. (2017c). *North America Biopesticides Market by Submarket (Biofungicide, Bioherbicide, Bioinsecticide, Bionematicide), by Active Ingredient (Microbial, Biorational, Others), by Crop Type, by End-use, by Formulation, By Geography - Analysis and Forecast to 2019*. Recuperado de http://www.micromarketmonitor.com/pressreleases/north-america-agriculture-biopesticides.html.

Mishra, J., Tewari, S., Singh, S., & Kumar, N. (2015). Biopesticides: Where We Stand? En N. K. Arora, (Ed.), *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets* (pp. 37-75). Nueva Delhi, India: Springer.

Mordor Intelligence. (2017). *Biopesticides Market - Latin America Industry Growth, Trends and Forecasts (2017-2022)*. Recuperado de https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/latin-american-biopesticides-market-industry.

Novasys Pharma. (2017). *Nematodos, una amenaza que tiene solución de forma ecológica*. Recuperado de http://novasys.es/nematodos-amenaza-tiene-solucion-ecologica/.

Oehlschlager, A. C., Chinchilla, C., Castillo, G., & González, L. (2002). Control of red ring disease by mass trapping of *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae). *Florida Entomologist, 85*(3), 507-513.

Olson, S. (2015). An analysis of the biopesticide market now and where it is going. *Outlooks on Pest Management, 26*(5), 203-206. doi:10.1564/v26_oct_04.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2015). *Iniciativa mundial sobre la reducción de la pérdida y el desperdicio de alimentos*. Recuperado de http://www.fao.org/3/a-i4068s.pdf.

Parlamento de la Unión Europea. (2009). Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 establishing a framework for community action to achieve the sustainable use of pesticides. En *Official Journal of the European Union* (pp. 71-86). Estrasburgo, Francia: Unión Europea.

Plant Health Care (PHC). (2017). *Control biológico del barrenador grande del hueso del aguacate. Información Técnica*. Recuperado de http://www.phcmexico.com.mx/search.php?q=care

PhillipsMcDougall. (2012). *AgriFutura (No. 253)*. Recuperado de https://www.phillipsmcdougall.com/home.asp.

PhillipsMcDougall. (2013). *AgriFutura (No. 162)*. Recuperado de https://www.phillipsmcdougall.com/home.asp.

Pratissoli, D., Lima, V. L., Pirovani, V. D., & Lima, W. L. (2015). Occurrence of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on tomato in the Espírito Santo state. *Horticultura brasileira, 33*(1), 101-105. doi:10.1590/S0102-053620150000100016.

Ravensberg, W. J. (2011). Critical factors in the successful commercialization of microbial pest control products. En W. J. Ravensberg (Ed.), *A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control of arthropods* (pp. 295-356). Dordrecht, Holanda: Springer.

Ravensberg, W. J. (2015). *Crop protection in 2030: towards a natural, efficient, safe and sustainable approach*. Ponencia presentada en Biopesticides innovative technologies and strategies for pest control. Swansea, Gales.

Rubio, V., & Fereres, A. (2002). *Control Biológico de Plagas y Enfermedades de los Cultivos*. Recuperado de http://digital.csic.es/bitstream/10261/13780/1/46. %20Rubio %20and %20Fereres %2C %202005.pdf.

Schisler, D., Slininger, P., Behle, R., & Jackson, M. (2004). Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. *Phytopathology, 94*(11), 1267-1271. doi:10.1094/PHYTO.2004.94.11.1267.

Seiber, J. N., Coats, J., Duke, S. O., & Gross, A. D. (2014). Biopesticides: state of the art and future opportunities. *Journal of Agriculture and Food Chemistry, 62*(48), 11613-11619. doi:10.1021/jf504252n.

Sundari, S., Singh, A., & Yadava, P. (2016). Review of current research advances in microbial and phyto-biopesticides. *International Journal of Biotechnology and Biomedical Science, 2*(1), 73-77.

The Economist. (2016). *The future of agriculture*. Recuperado de http://www.economist.com/technology-quarterly/2016-06-09/factory-fresh.

The Economist. (2017). *Why companies in the chemicals industry are mixing*. Recuperado de https://www.economist.com/news/business/21722701-farmers-chagrin-deal-mania-has-seized-chemicals-suppliers-why-companies-chemicals.

Trebilcock, P. (2016a). Biocontrol en Latinoamérica, Tierra de oportunidades. *Revista New Age International*. (octubre/noviembre), 50-60.

Trebilcock, P. (2016b). Brasil: Los Nuevos pasos del Laboratorio de Farroupilha Lallemand. *Revista New Age International*. (octubre/noviembre), 32-33.

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), 1-21. doi:10.1007/s10526-017-9801-4.

Capítulo 17

El control biológico en un contexto de manejo integrado de enfermedades

Chapter 17

Biological control in the context of integrated plant diseases management

Alba Marina Cotes,[1] Yigal Elad[2]

[1] Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA)

[2] Department of Plant Pathology and Weed Sciences, ARO, The Volcani Center

Contenido

Introducción 798

Elementos básicos y componentes del manejo integrado de enfermedades 798

- El suelo como fundamento del manejo integrado de plagas 800
- Resistencia genética 801
- Control por los microbiomas, resistencia inducida y *priming* 802
- Diversidad botánica inter e intraespecífica 806
- Rotación de cultivos 807
- Control cultural, mecánico, físico y óptico 808

Implementación del manejo integrado de enfermedades 809

Consideraciones finales y conclusiones 812

Agradecimientos 813

Referencias 814

Resumen

El suelo es un sistema biológico complejo y dinámico que constituye el pilar fundamental del manejo integrado, debido a las relaciones que en él existen entre la diversidad microbiana, por una parte, y su funcionamiento y estabilidad, por otra. El manejo integrado de enfermedades consiste en la utilización oportuna de diferentes componentes que representan otras tantas tácticas adecuadas para el cultivo. Estos componentes incluyen la selección y preparación del terreno, el control biológico, el uso de cultivares resistentes, la resistencia inducida, el *priming*, la rotación de cultivos, la diversidad botánica y genética (inter e intraespecífica), la modificación del medio ambiente y, si es necesario, la aplicación de plaguicidas. Estos componentes deben aplicarse de manera coordinada e integrada para maximizar sus beneficios y deben ser compatibles con las prácticas culturales esenciales para el cultivo; sin embargo, la integración de los diferentes componentes exige un alto nivel, es intensiva en conocimiento técnico, experiencia y destreza, y requiere de una mejor comunicación con los productores y de tecnologías innovadoras que mejoren la efectividad del programa de manejo. Aquí discutimos los enfoques y métodos disponibles, identificamos algunos de los desafíos y oportunidades, y recomendamos la interacción entre científicos de diferentes disciplinas, asistentes técnicos y productores, para desarrollar e implementar programas de manejo integrado de enfermedades.

Palabras clave

Biodiversidad, control biológico, fitopatógenos, prácticas culturales, resistencia, suelo

Abstract

Soil is a complex and dynamic biological system that constitutes a fundamental pillar of integrated management due to relationships between microbial diversity and soil functioning, as well those between its stability and microbial diversity. Integrated Disease Management consists of timely use of a combination of different strategies and tactics suitable for cultivation. These include site selection and preparation, biological control, use of resistant cultivars, induced resistance, priming, crop rotation, inter- and intra-specific botanical diversity, modification of the environment, and application of pesticides, if necessary. These components must be applied in a coordinated integrated manner to maximize their benefits and must be compatible with the cultural practices essential for maximizing the crop yield. However, the integration of the different components is knowledge intensive and requires communication with users and innovative technologies that improve the effectiveness of the management program. Here we discuss approaches and methods available, we identify some of the challenges and opportunities and recommend interaction among scientists from different disciplines, technical assistants and producers to develop and implement integrated disease programs.

Keywords

Biodiversity, biological control, cultural practices, plant pathogens, resistance, soil

Introducción

El manejo integrado de plagas (MIP) aplicado a las enfermedades vegetales (también llamado manejo integrado de enfermedades [MIE]) comprende el uso de todas las estrategias disponibles para garantizar al productor rendimiento y calidad aceptables, a un menor costo, y que sean compatibles con principios de sostenibilidad ambiental. Un programa exitoso de MIE depende del sistema de producción del cultivo objetivo, en el que el manejo de enfermedades debe alinearse con las prácticas de manejo de insectos plaga y malezas, con el manejo de la fertilización y con las demás actividades que requiera el cultivo.

Este programa agrupa varios requerimientos: la selección de variedades apropiadas; un método de trasplante que minimice el estrés; un sistema de producción de plántulas o material de siembra de alta calidad; un plan de riego que minimice la humedad de las hojas y la saturación de agua en el suelo; un programa de fertilización que permita el desarrollo óptimo de la planta, sin estimular la aparición de enfermedades; el uso de densidades de siembra adecuadas; el manejo del dosel de las plantas que brinde circulación de aire; la optimización en la aplicación de los plaguicidas químicos que se requieran; el monitoreo efectivo de las enfermedades y, finalmente, un procedimiento de recolección y manejo de los residuos de cosecha y por supuesto un programa de cosecha y poscosecha que mantengan la calidad del producto y maximicen su vida útil (Paret, Dufault, Momol, Marois, & Olson, 2015).

El MIE, como aproximación holística, busca controlar las plagas implicadas en el desarrollo de enfermedades (fitopatógenos, insectos, etc.) usando los métodos disponibles que sean adecuados para el cultivo, con aplicaciones mínimas de plaguicidas (Dent, 2000; Peshin & Dhawan, 2009), dado que el propósito no es el de erradicarlas sino de mantenerlas por debajo del nivel de daño económico (Smith & Van den Bosch, 1967; Stern, Smith, Van den Bosch, & Hagen, 1959). Esta aproximación reduce la exposición de agricultores y consumidores a la toxicidad generada por la mayoría de los plaguicidas y al riesgo de desarrollo de resistencia de estas plagas frente a los plaguicidas utilizados.

El MIE implica que haya compatibilidad entre al menos dos componentes de fitoprotección. En el sentido amplio de la palabra y desde una perspectiva holística, el MIE debe ir más allá de la suma de diferentes componentes individuales de fitoprotección. Este concepto consiste en explotar la sinergia que resulta de combinar métodos tradicionales y nuevos, tanto para el control, como para la prevención, lo que permite optimizar las soluciones para la protección de cultivos (Stenberg & Muola, 2017). Sin embargo, para lograrlo, es necesario contar con equipos de trabajo multidisciplinarios, que puedan llevar a cabo programas de investigación interdisciplinaria y transdisciplinaria (Smith & Van den Bosch, 1967; Stern et al., 1959). A continuación, se ampliará la información sobre los principales componentes del MIE, así como sus aplicaciones prácticas, tendencias, limitantes y oportunidades.

Elementos básicos y componentes del manejo integrado de enfermedades

Los principales elementos individuales del MIE son los siguientes: el control biológico (discutido ampliamente en este libro en los capítulos 1-12, 19 y 20); la resistencia genética de las plantas (Mitchell, Brennan, Graham, & Karley, 2016; Stenberg, 2017; Stenberg & Muola, 2017); la resistencia inducida y el *priming*, por el que la planta se prepara para un posible ataque y que representa una estrategia adaptativa que mejora la capacidad defensiva de las plantas (Cotes, Cárdenas, & Pinzón, 2001; Jacqmin, Cotes, Lepoivre, & Semal, 1993;

Rosenthal & Berenbaum, 2012); la diversidad botánica y genética inter e intraespecífica; la rotación de cultivos; las prácticas de control cultural, mecánico, físico y óptico (trampas de color, coberturas plateadas, etc.), y los plaguicidas químicos (figura 17.1), que solo deben aplicarse cuando sea necesario (Stenberg & Muola, 2017).

Las prácticas de manejo de enfermedades en plantas se basan en anticipar la aparición de la enfermedad y atacar puntos vulnerables en el ciclo de vida del patógeno. Para un manejo efectivo de cualquier enfermedad, es esencial un entendimiento exhaustivo de su epidemiología, incluyendo los factores climáticos y ambientales que la afectan y de las necesidades de manejo cultural de la planta (Maloy, 2005). Un programa de MIE debe tener en consideración las siguientes actividades: 1) la prevención, que consiste en restringir la entrada de patógenos en los campos a través de materiales de siembra, agua de riego, trabajadores y herramientas; 2) el monitoreo constante del cultivo para localizar la presencia de síntomas de enfermedades y de los vectores, cuando los haya; 3) el diagnóstico preciso de las enfermedades; 4) el desarrollo de umbrales de daño y de acción aceptables, que es posible si se comprende el efecto de una enfermedad y su impacto sobre el rendimiento del cultivo, y 5) la selección óptima de los componentes de manejo específicos para la enfermedad, teniendo en cuenta su historial en el campo de cultivo y los componentes de manejo del cultivo. Este último aspecto es muy relevante para evaluar el riesgo en la producción; la toma de decisiones

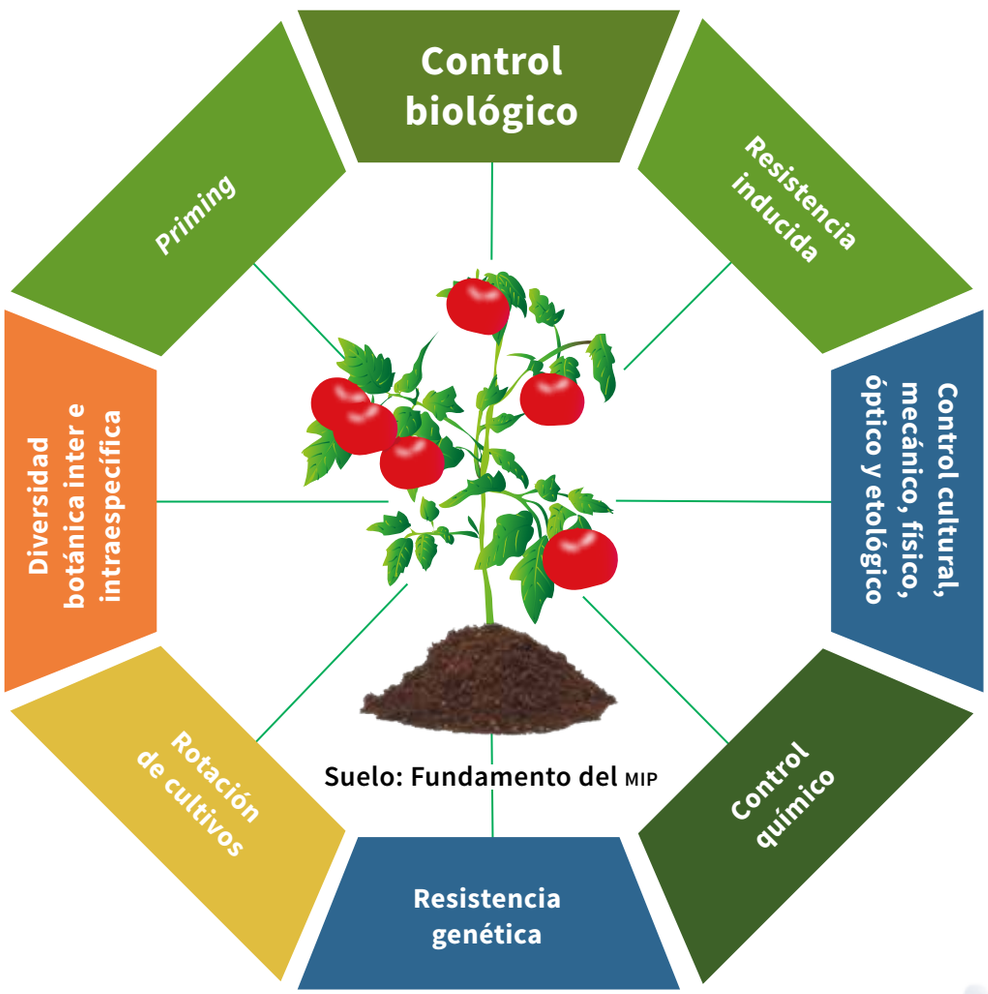


Figura 17.1. Principales componentes del manejo integrado de enfermedades.

Fuente: Elaboración propia

respecto al uso de control cultural, resistencia genética de la planta huésped, control biológico y químico debe basarse en las condiciones específicas de la enfermedad por controlar (Paret et al., 2015).

El suelo como fundamento del manejo integrado de plagas

El suelo alberga más de una cuarta parte de todas las especies vivas en la tierra, incluyendo las bacterias, Archaea, hongos, protozoos, algas y ciertos animales como rotíferos (Bhattarai, Bhattarai, & Pandey, 2015). Se estima que 1 g de suelo seco contiene hasta 1.000 millones de células bacterianas conformadas por decenas de miles de taxones, hasta 200 millones de hifas fúngicas y una amplia variedad de ácaros, nematodos, lombrices y artrópodos (Bardgett, 2005; Roesch et al., 2007) (figura 17.2). Esta diversidad oculta contribuye a la biomasa terrestre total y está íntimamente ligada con la biodiversidad aérea (Fierer Strickland, Liptzin, Bradford, & Cleve-land, 2009; Wardle et al., 2004). En los últimos años, varios estudios han demostrado que las actividades antropogénicas (el cambio de uso del suelo o la intensificación agrícola, con la consecuente sobreutilización de agroquímicos y que frecuentemente mata muchos organismos) han reducido la abundancia microbiana y faunística y, en consecuencia, la diversidad general de los organismos del suelo (De Vries et al., 2013; Helgason, Daniell, Husband, Fitter, & Young, 1998), lo que puede afectar numerosas funciones del ecosistema, como la adquisición de nutrientes por las plantas y el reciclaje de recursos entre las comunidades (De Vries et al., 2013; Helgason et al., 1998; Van der Heijden, Bardgett, & Van Straalen, 2007; Wall, Bardgett, & Kelly, 2010).

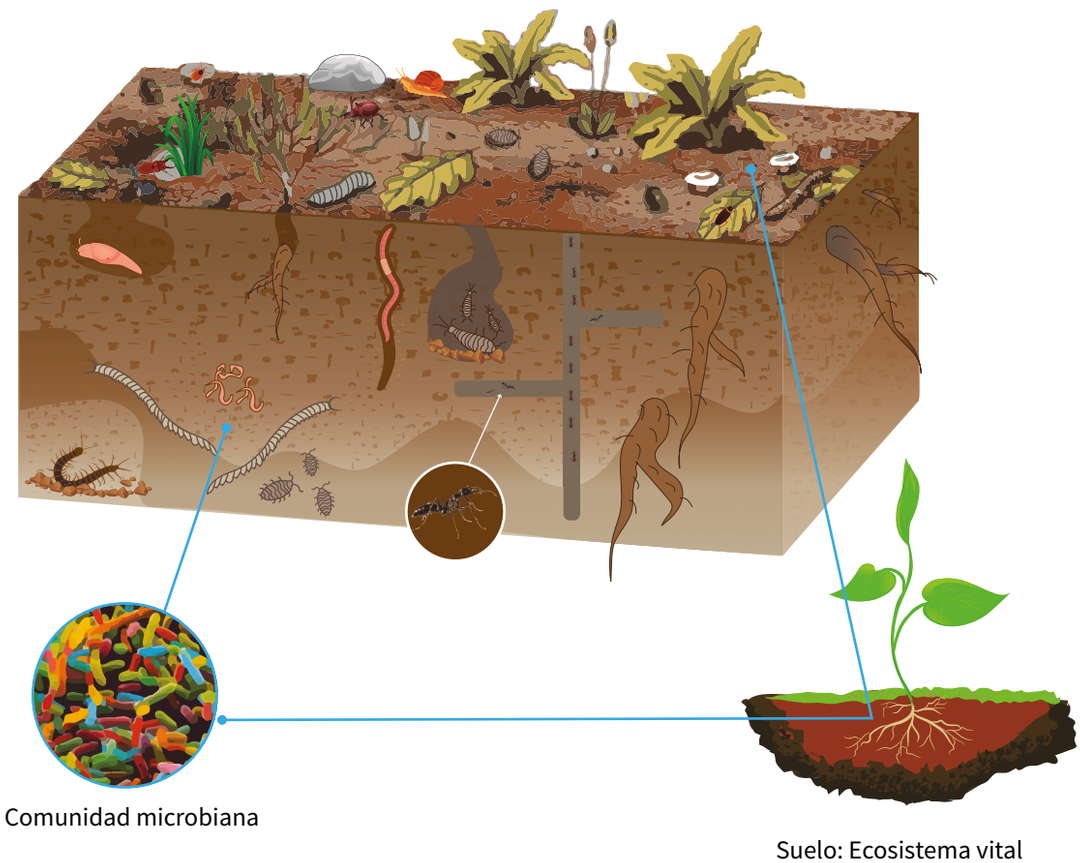


Figura 17.2. Suelo saludable con capacidad continua para funcionar como un ecosistema vital que sustenta plantas, animales y humanos.

Fuente: Elaboración propia

Sin embargo, de un estimado de un trillón de especies microbianas, solo el 1 % ha sido identificado (Locey & Lennon, 2016), lo que da cuenta del grave riesgo de pérdida de biodiversidad, si se continúa con la destrucción de los microorganismos en los agroecosistemas; esto, además, podría afectar la salud vegetal y, por ende, la producción agrícola. Las comunidades microbianas en el suelo consisten en una muy amplia gama en diferentes estados fisiológicos. Los microorganismos en el suelo son frecuentemente clasificados como activos, viables, vivos, inactivos, pasivos, moribundos y muertos (Johnsen, Jacobsen, Torsvik, & Sørensen, 2001). Los microorganismos activos componen entre el 0,1 y el 2 % de la biomasa microbiana total, y muy raramente exceden el 5 %. No obstante, la fracción de microorganismos potencialmente activos, es decir, los viables y vivos que están listos para utilizar los sustratos disponibles en pocas horas, son mucho más numerosos y constituyen entre un 10 % y un 40 % (hasta un 60 %) de la biomasa microbiana total (Blagodatskaya & Kuzyakov, 2013).

Los microorganismos activos están involucrados en la utilización continua de sustratos y productos bioquímicos asociados a sus transformaciones. Los microorganismos viables potencialmente activos se encuentran en estado de alerta fisiológica (De Nobili, Contin, Mondini, & Brookes, 2001; Raubuch, Behr, Roose, & Joergensen, 2010) y pueden empezar a utilizar sustratos en cuestión de minutos o en pocas horas. Los microorganismos vivos, pero en estado inactivo, en condiciones normales no contribuyen a dichos procesos, pero pueden hacerlo bajo ciertas circunstancias cuando se producen alteraciones en el suelo, mientras que los microorganismos muertos (incluidas las células lisadas y los residuos microbianos) no contribuyen directamente en ningún proceso, pero afectan la rotación de C y N como fuentes de nutrientes fácilmente disponibles. Todas estas partes de la biomasa microbiana total son cruciales para evaluar las funciones del suelo y pueden sufrir variaciones de acuerdo con las condiciones ambientales, el uso del suelo y las prácticas de manejo (Blagodatskaya & Kuzyakov, 2013).

Resistencia genética

En su mayoría, los cultivares modernos incluyen genes de resistencia directa o indirecta. Investigaciones recientes han encontrado que muchos de esos genes muestran importantes rasgos de resistencia que son compartidos con sus plantas silvestres relacionadas (Muola et al., 2017; Tamiru et al., 2011). En muchos casos, la resistencia es de naturaleza multigénica y pleotrópica, que regula muchos mecanismos, lo que constituye un desafío para los mejoradores; por esta razón, en muchos casos no ha habido éxito en este tipo de mejoramiento, ya que, además, las plantas mejoradas deben mantener las características de productividad y las exigidas por el mercado. Por ejemplo, los compuestos volátiles y el néctar extrafloral son defensas comunes de las plantas silvestres, pero su potencial aún no se ha utilizado en los cultivos, a pesar de que podrían utilizarse para el control de insectos plaga y de enfermedades. La emisión de olores y la secreción de néctar son rasgos multigénicos, y la expresión de estos rasgos en los cultivos modernos ha cambiado, debido a la domesticación de las plantas. En ese sentido, Stenberg, Heil, Åhman y Björkman (2015) proponen que, en el mejoramiento genético de los cultivos, se tengan en cuenta las interacciones tritróficas y la resistencia directa mediada por volátiles a herbívoros y patógenos, ya que muchos volátiles de plantas naturales tienen propiedades antifúngicas o repelentes. Este tema se amplía en los capítulos 19 y 23 de este libro.

La resistencia intrínseca de las plantas no solo afecta a las plagas (fitopatógenos, insectos), sino también a los agentes de control biológico (Chen, Gols, Stratton, Brevik, & Benrey, 2015; Stenberg et al., 2011; Stenberg et al., 2015). Sin embargo, todavía se desconoce en gran medida cómo la resistencia de las plantas se afecta en presencia y ausencia de agentes de control biológico (Peterson, Ode, Oliveira-Hofman, & Harwood, 2016).

Un problema importante en la agricultura moderna es la rápida evolución de las plagas contra la resistencia de los cultivares (Ayliffe, Singh, & Lagudah, 2008; Delmas et al., 2016; Gassmann et al., 2014). Investigaciones recientes sugieren que las razas de plagas capaces de romper la resistencia de las plantas pueden ser controladas con agentes de control biológico (Liu et al., 2014). El espacio para tener una resistencia duradera con control biológico se abrió hace 27 años, cuando Gould, Kennedy y Johnson (1991) sugirieron que los agentes de control biológico pueden retrasar la evolución de la resistencia en las plagas al disminuir su aptitud diferencial entre cultivares resistentes y susceptibles. Esta hipótesis se comprobó en experimentos en brócoli

transformado con el gen que expresa la toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis*, contra *Plutella xylostella* y sus escarabajos depredadores (Liu et al., 2014). Como se predijo, el herbívoro presentó resistencia a la toxina Cry1Ac mucho más lentamente en presencia de los escarabajos biocontroladores que en ausencia de estos. Se podría presumir, entonces, que también se pueda presentar este fenómeno en presencia de microorganismos biocontroladores de enfermedades. A pesar de las posibilidades de aumentar la durabilidad de la resistencia de los cultivos mediante la combinación con el control biológico, esta opción ha recibido muy poca atención por parte de los investigadores en MIP.

Por otra parte, en la nueva era de la ecología y con el avance tecnológico de vanguardia, los fitomejoradores buscan nuevas fuentes de variabilidad en las plantas, gracias a los estudios sobre el microbioma, ya que el material genético vegetal se debe considerar no solo como un individuo en su nivel genómico, sino como una entidad genética que comprende su genoma microbiano asociado. Estos estudios han dado lugar al concepto de "holobionte" (Rosenberg & Zilber-Rosenberg, 2016; Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008), que representa el conjunto del individuo vegetal con sus simbiontes viviendo y funcionando como una unidad (Bordenstein & Theis, 2015; Theis et al., 2016), y que tiene la capacidad de replicar y transmitir su composición genética (Booth, 2014; Van Opstal & Bordenstein, 2015). El fenotipo del complejo simbiótico se rige por su holobioma u hologenoma que comprende los genomas vegetal y microbiano (Bordenstein & Theis, 2015; Guerrero, Margulis, & Berlanga, 2013). Es necesario considerar, entonces, la importancia del microbioma en el material de siembra, en las semillas y en la rizosfera, como elementos que tienen efectos directos sobre la salud y la productividad de las plantas (Berendsen, Pieterse, & Bakker, 2012; Berg, Grube, Schloter, & Smalla, 2014a; Berg, Rybakova, Grube, & Koberl, 2016; Pieterse, de Jonge, & Berendsen, 2016). En el capítulo 4 de este libro se amplía este tema.

Control por los microbiomas, resistencia inducida y *priming*

Tanto el MIP como el MIE deben tener como objetivo común buscar la sostenibilidad de los sistemas de producción agrícola y reducir su impacto ambiental. Dentro de ese contexto, el control biológico, entendido de forma amplia, está en el centro de esta filosofía; por lo tanto, no debe incluir solamente a las plagas por controlar, sino que debe tener como punto de partida la preservación de la salud del suelo, que se define como su capacidad para funcionar como un ecosistema vivo. Así pues, un suelo saludable mantiene una comunidad diversa de organismos que ayudan a controlar enfermedades, insectos y malezas; además de formar asociaciones simbióticas beneficiosas con raíces de plantas, reciclar nutrientes esenciales de plantas y mejorar la estructura del suelo, tiene efectos positivos en la retención de humedad y en la retención de nutrientes para mejorar la producción agrícola y para mantener o aumentar la fijación de carbono, lo que ayuda a mitigar el cambio climático (United States Departmen of Agriculture [USDA], 2018).

Microorganismos biocontroladores

Como ya se mencionó, en este libro se hace un análisis detallado de los diferentes microorganismos biocontroladores, utilizados en el control de enfermedades, desde su aislamiento y evaluación de eficacia, hasta el desarrollo de bioplaguicidas y puesta en el mercado. Estos temas se amplían en los capítulos 1 a 4, 11, 12, 16, 17, 19, 20 y 23.

El microbioma vegetal también constituye una parte fundamental del MIE. Este tema fue profundizado en el capítulo 4 de este libro. Dicho microbioma incluye la comunidad microbiana que interactúa con las plantas y puede sobrevivir dentro o fuera de los tejidos vegetales, con profundos efectos sobre la germinación de las semillas, el vigor de las plántulas, la nutrición, la salud de las plantas y el desarrollo del sistema inmune innato (Berg, Grube, Schloter, & Smalla, 2014b; Mendes, Garbeva, & Raaijmakers, 2013; Schikora, Schenk, & Hartmann, 2016). La composición de las comunidades microbianas es específica del huésped y está relacionada con su estado de salud (Berg et al., 2014b). Los desequilibrios causados por la aplicación de las prácticas de manejo del cultivo inducen perturbaciones en las especies microbianas que lo componen y pueden provocar enfermedades (Berg et al., 2014a), por lo

que para restablecer o mantener la salud del huésped se pueden aplicar soluciones biológicas que respalden la capacidad biocontroladora de fitopatógenos. En estos se incluyen los probióticos, los microorganismos simbióticos y los agentes de control biológico (De Vrese & Schrezenmeir, 2008). Dicho microbioma puede ser mediado por la planta huésped y ser transgeneracional (Mitter et al., 2017; Orozco-Mosqueda, Rocha-Granados, Glick, & Santoyo, 2018). No obstante, aún falta mucho conocimiento para entender las interacciones multitróficas del microbioma, por lo que no ha sido posible desarrollar su potencial con miras al desarrollo de métodos más eficaces y sostenibles para el manejo de enfermedades.

El término "probiótico vegetal" se utiliza para referirse a aquellos microorganismos que viven naturalmente en un ambiente y suprimen patógenos (Hu et al., 2016). La definición de las comunidades probióticas efectivas debe estar basada en la caracterización de su funcionamiento. Al respecto, se ha demostrado que el aumento de la diversidad de los consorcios probióticos aumenta la supervivencia de la comunidad en el microbioma rizosférico que es naturalmente diverso, lo que lleva a una mayor supresión de patógenos, a través de la competencia intensificada de recursos y la interferencia con el patógeno. Sin embargo, todavía no está claro cuántas cepas se deben elegir para construir consorcios probióticos eficaces, por lo que el estudio y definición de las pautas ecológicas que los regulan podrían llevar en el futuro a avances importantes en la ingeniería de microbiomas (Hu et al., 2016). Tal conocimiento del microbioma multitrófico y sus interacciones tiene el potencial de ser utilizado para el desarrollo de un manejo más eficaz y sostenible de las enfermedades de las plantas (figura 17.3).

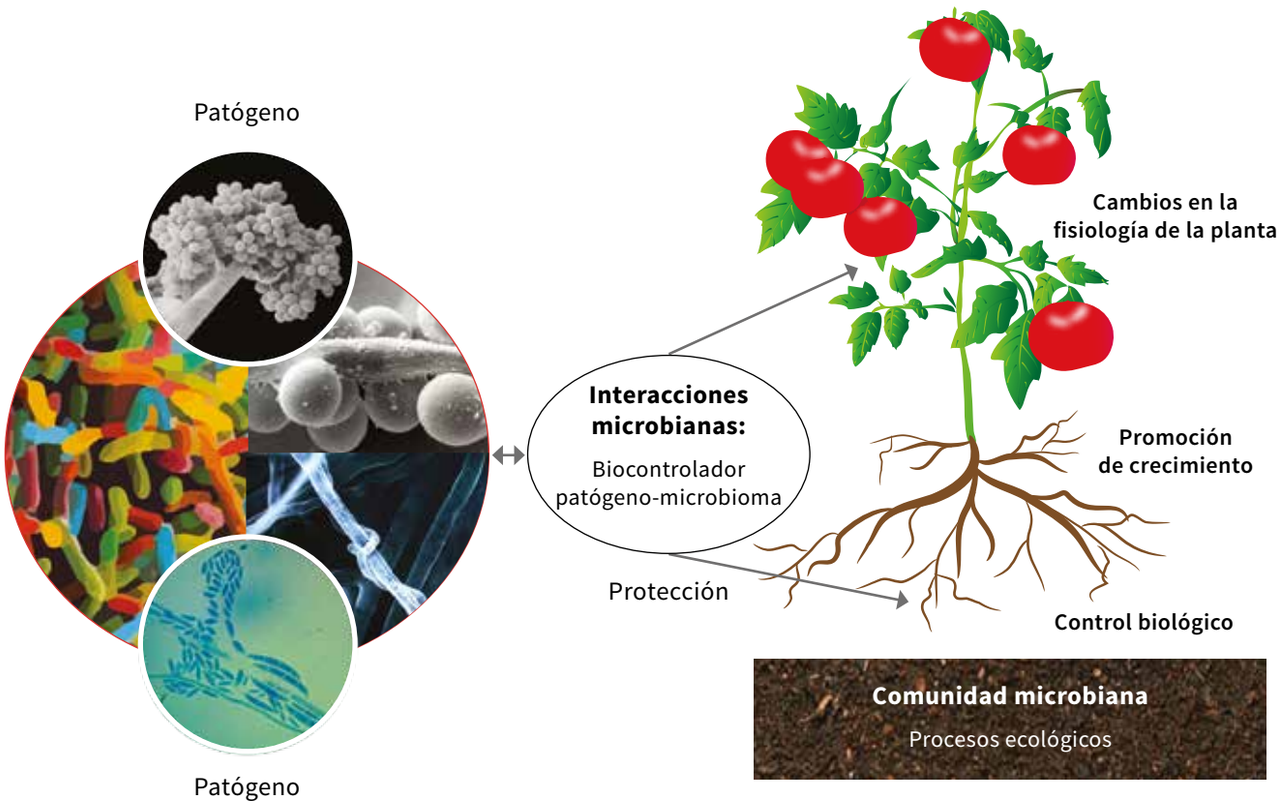


Figura 17.3. Interacciones microbianas y su relación con el control biológico de fitopatógenos.

Fuente: Elaboración propia

Resistencia inducida

Otro elemento individual del MIE es la resistencia inducida, si se tiene en cuenta que las plantas frecuentemente responden a la exposición a agentes físicos, patógenos y agentes de control biológico (Perazzolli, Roatti, Bozza, & Pertot, 2011; Regliński et al., 2012; Tucci, Ruocco, De Masi, De Palma, & Lorito, 2011; Yoshioka, Ichikawa, Naznin, Kogure, & Hyakumachi, 2012; Da Rocha & Hammerschmidt, 2005; Lyon, 2007), o químicos (Kessler & Ian, 2004), activando mecanismos de defensa. En términos generales, la resistencia inducida se puede dividir en dos principales tipos: 1) resistencia sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés) y 2) resistencia sistémica inducida (ISR, por sus siglas en inglés). La primera es inducida por fitopatógenos y ciertos compuestos químicos (por ejemplo, acibenzolar-S-metil, ASM) y es mediada por un proceso dependiente del ácido salicílico (SA) (Spoel & Dong, 2012), mientras que la ISR se desarrolla como resultado de la colonización de las raíces de las plantas por rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR) o por otros biocontroladores tales como *Trichoderma* spp. Este tipo de resistencia está mediada por el jasmonato (JA) y etileno (ET) (Moreno et al., 2009; Spoel & Dong, 2012).

El primer inductor químico de resistencia reconocido fue el probenazol, registrado como Oryzemate en 1975, en Japón; posteriormente, se han desarrollado muchos otros, dentro de los que se destacan el acibenzolar-S-metil (ASM) registrado como Bion y como Actigard (Syngenta); Milsana (Extracto de *Reynoutria sachalinensis*; KHH BioScience); Elexa (quitosán; SafeScience) y Messenger (proteína harpina) registrado por Plant Health Care (Walters, Ratsep & Havis, 2013). La creciente investigación en este tema ha permitido el descubrimiento de las propiedades inductoras de resistencia de agentes tales como el benzotiadiazol (Katz, Thulke, & Conrath, 1998), el ácido β-aminobutírico (BABA) (Oostendorp, Kunz, Dietrich, & Staub, 2001), el ácido salicílico y el 2,6-ácido dicloroisonicotínico (Kauss, Theisinger-Hinkel, Mindermann, & Conrath, 1992), la sacarina (Srivastava, George, Marois, Wright, & Walker, 2011), el fosfito de potasio (Pinto, do Nascimento, de Souza-Gomes, da Silva, & dos Reis-Miranda, 2012), la tiamina (Pushpalatha, Sudisha, Geetha, Amruthesh, & Shekar-Shetty, 2011), el biocarbón o *biochar* por su nombre en inglés (carbono vegetal calcinado en condiciones anaerobias) (Elad et al., 2010), el silicio (Shetty et al., 2012) y muchos otros (Walters et al., 2013). Además, en la actualidad a muchos de los bioplaguicidas registrados se les atribuyen propiedades de inducción de resistencia sistémica, tema que se amplía en los capítulos 1, 2 y 3 de este libro.

A pesar de lo promisorio de la resistencia inducida como estrategia de fitoprotección, es necesario considerar varios factores que pueden limitar su implementación. Uno de ellos es que el genotipo huésped puede afectar su expresión (Resende et al., 2002; Tucci et al., 2011). Asimismo, en muchos casos se ha demostrado que la defensa de plantas es costosa en términos metabólicos, pues requiere energía por parte de la planta, ocasionando reducción de su desarrollo (Herms & Mattson, 1992). En términos prácticos de control de la enfermedad, la frecuencia de la aplicación de los inductores es una consideración crucial, siendo ideal en general aquellos que tengan un efecto de larga duración, ya que requieren de menos aplicaciones; pero este no es siempre el caso, ya que la resistencia de las plantas frecuentemente es de corta duración. Otra consideración importante es el tipo de aplicación que se debe hacer, pues en ocasiones se requieren varias aplicaciones al follaje o a las raíces, lo que implica alto consumo del producto. Los tratamientos de semillas son una alternativa útil, ya que pueden proporcionar protección a las plantas jóvenes durante un período vulnerable en su desarrollo y requieren menor gasto del producto. Este tema se amplía en los capítulos 1, 2 y 20 del presente libro.

Priming

Las plantas también pueden ser "vacunadas" mediante la exposición a factores que inducen resistencia, lo que las prepara (*priming*, por el término en inglés) ante un posible ataque de un agente biótico o ante una situación de estrés abiótico. Este fenómeno está marcado por una activación mejorada de los mecanismos de defensa inducida. Estímulos de fitopatógenos, artrópodos, biocontroladores, productos químicos y señales abióticas pueden desencadenar el establecimiento de

priming actuando como señales de advertencia (Mauch-Mani, Baccelli, Luna, & Flors, 2017; Pineda, Kaplan, & Bezemer, 2017; Walters & Fountaine, 2009). Tras la percepción del estímulo, ocurren cambios en la planta a nivel fisiológico, transcripcional, metabólico y epigenético. En un desafío posterior, la planta efectivamente presenta una respuesta de defensa más rápida o más fuerte que define su estado de preparación dispuesto ante el desafío, respondiendo en general con una mayor resistencia o tolerancia al estrés (Balmer, Pastor, Gamir, Flors, & Mauch-Mani, 2015; Goellner & Conrath, 2008; Martinez-Medina et al., 2016). Ahmad, Gordon-Weeks, Pickett y Ton (2010) sugieren que la mayoría de los fenómenos de resistencia inducida están basados en una combinación de inducción directa y de *priming*. La respuesta de la planta relacionada con el *priming* puede ser duradera y mantenerse durante todo su ciclo de vida, e incluso se puede transmitir a las siguientes generaciones, por lo que representa un tipo de memoria inmunológica vegetal (Mauch-Mani et al., 2017).

El *priming* inducido mediante el tratamiento de semillas es de gran valor, especialmente para cultivos que puedan sufrir el ataque temprano de fitopatógenos y de insectos plagas. Si este efecto es duradero, se reduciría la necesidad de tratamientos adicionales de protección de cultivos (biocontroladores, elicitores o plaguicidas químicos). Además, la posibilidad de lograr efectos transgeneracionales, como han sugerido varios autores, garantizaría mayor duración del fenómeno. Al respecto, Worrall et al. (2011) demostraron efectos a largo plazo del *priming* cuando trataron semillas con ácido jasmónico y con ácido β-aminobutírico (BABA). Para explicar este fenómeno sugirieron modificaciones epigenéticas que ocurren en los genes de tejidos embrionarios durante la imbibición de las semillas, lo que concuerda con efectos transgeneracionales de resistencia inducida demostrados en *Arabidopsis thaliana*, tomate y cebada (Luna, Bruce, Roberts, Flors, & Ton, 2012; Rasmann et al., 2012; Slaughter et al., 2011; Walters & Paterson, 2012). Al respecto, Luna et al. (2012) también encontraron que la progenie de *Arabidopsis* inoculada con la bacteria patógena *Pseudomonas syringae* pv. tomate (PstDC3000) estaba preparaba para activar los genes de defensa inducible relacionados con el ácido salicílico, siendo dicha progenie más resistente al hongo patógeno *Hyaloperonospora arabidopsidis* y a PstDC3000. Este SAR transgeneracional sugiere una base epigenética del fenómeno.

El *priming* es una estrategia efectiva para combatir estrés biótico y abiótico, que representa un enfoque potencial para mejorar la protección fitosanitaria en los sistemas agrícolas (Walters et al., 2013). Aunque el *priming* rara vez conduce al control completo de los fitopatógenos, frecuentemente reduce su severidad (Kuć, 1982). Como hay una urgente necesidad de nuevas estrategias que no dependan de plaguicidas químicos o de genes únicos de resistencia, la explotación de la capacidad del sistema inmune de la planta, en combinación con otras estrategias, puede tener el potencial para lograr una mejor protección de los cultivos. El atractivo del *priming*, a diferencia de la inducción directa de defensas, es que no ocasiona costos importantes para su implementación (Van Hulten, Pelser, Van Loon, Pieterse, & Ton, 2006), ya que frecuentemente el tratamiento se aplica a las semillas o las plántulas antes de llevarlas al sitio definitivo. Por ejemplo, trabajos recientes de Worrall et al. (2011) demostraron que el tratamiento de semillas de tomate con JA y plantas tratadas con BABA mejoraron la defensa contra insectos plaga y contra patógenos. Asimismo, plantas cultivadas a partir de semillas tratadas con JA tuvieron aumento de una amplia resistencia contra el ataque de ácaros, orugas, áfidos y también contra el hongo patógeno necrótrofo *Botrytis cinerea*. De otra parte, Jacqmin et al. (1993) y Cotes et al. (2001) demostraron que el tratamiento de semillas de cohombro y de tomate con el hongo *Trichoderma koningiopsis* Th003 (antes *Trichoderma koningii*) fue suficiente para activar el *priming* y ejercer un control efectivo del volcamiento (*damping off*), producido por *Pythium splendens* y *Rhizoctonia solani*, respectivamente.

Además, el trasplante de "suelo saludable" que contiene microorganismos benéficos también puede inducir el *priming* y así activar las respuestas de defensa de las plantas (Pineda et al., 2017). Se ha demostrado que la supresividad microbiana del suelo puede ser transferida mezclando proporciones de suelo supresivo (1-10 % p/p) con un suelo conductivo, lo que indica que la supresividad del suelo se debe a las comunidades microbianas reclutadas por la raíz, que pueden ejercer

un control directo o indirecto de los fitopatógenos, en este último caso, mediante la inducción de resistencia (Klein, Ofek, Katan, Minz, & Gamliel, 2012; Mendes et al., 2011; Postma, Scheper, & Schilder, 2010).

La investigación sobre la vacunación de plantas en el contexto del MIP es aún limitada (Moya-Elizondo & Jacobsen, 2016). En general, los efectos del *priming* y la inducción de resistencia dependen del genotipo de la planta (Paparella et al., 2015). Por ejemplo, las gramíneas Hordeeae, como el trigo, la cebada, el centeno y la avena, pueden ser vacunadas contra una variedad de herbívoros utilizando al hongo *Epichloë*, que produce metabolitos secundarios tipo alcaloides; sin embargo, los efectos de *Epichloë* pueden ser positivos o negativos, dependiendo del genotipo de la planta y de los intereses de los agricultores y ganaderos, ya que la toxicidad a insectos herbívoros también se extiende a ganado vacuno y a humanos (Simpson et al., 2014). Estos hallazgos brindan a los mejoradores nuevas oportunidades para optimizar los efectos de la vacunación de las plantas, pero muestran que es necesario tener en consideración la importancia de tratar las semillas o el material de propagación durante la etapa de producción de material de siembra, para garantizar efectos positivos.

Una posible desventaja del *priming* es que, bajo circunstancias específicas, los estados epigenéticos no pueden transmitirse a la progenie o podrían mostrar heredabilidad parcial dentro de una población. No obstante, el conocimiento de la existencia del *priming* abre oportunidades para explorar nuevos elicitores, analizar nuevos epialelos metaestables o explorar nuevas combinaciones de tratamientos que conduzcan al *priming* (Ramírez-Carrasco, Martínez-Aguilar, & Alvarez-Venegas, 2017). Un posible riesgo es que la inducción de las defensas de las plantas o *priming* no solo afecte a las plagas, sino también a los organismos benéficos cuando estos son expuestos a dichas respuestas de defensa (Thaler, Olsen, & Kaplan, 2015). Por lo tanto, algunos agentes de control biológico podrían ser introducidos a las semillas y a las plántulas en viveros para su vacunación y antes de que sean expuestas a otros agentes de control biológico durante el cultivo. Es posible también que haya sinergias entre la vacunación de las plantas y el control biológico, pero estas sinergias están casi completamente inexploradas y son objetivos de investigación.

Teniendo en cuenta la importancia de integrar diferentes componentes de control dentro de un manejo integrado, la combinación de elicitores y fungicidas químicos con agentes biocontroladores puede resultar en una alta respuesta de control. Este tipo de aproximaciones ya han sido demostradas, como en la combinación en tomate de acibenzolar-S-metil (ASM) con *Pseudomonas fluorescens* (Pf2), que resultó más eficiente en el control de *Ralstonia solanacearum* que cualquiera de los agentes aplicados individualmente (Abo-Elyousr, Ibrahim, & Balabel, 2012). Esta sinergia también fue demostrada por Myresiotis, Karaoglanidis, Vryzas y Papadopoulou-Mourkidou (2012), al evaluar cuatro bioplaguicidas comerciales a base de *Bacillus* spp. combinados con ASM o con un fungicida químico en el cultivo de tomate, obteniendo un control significativamente mayor contra la pudrición de corona y de raíz causadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, en comparación con cualquiera de los tratamientos aplicado solo. Es necesario, por lo tanto, desarrollar nuevos enfoques de manejo integrado para controlar las enfermedades de las plantas, en los que la resistencia inducida ofrezca la posibilidad de lograr un control duradero y de amplio espectro.

Diversidad botánica inter e intraespecífica

Los monocultivos con uniformidad genética son propensos a favorecer el aumento de nuevas variantes de insectos plaga o de patógenos por su misma homogeneidad genética (Andow, 1983). Por lo tanto, la introducción de diversidad botánica y genética intra e interespecífica en los campos de cultivo es una estrategia que permite reducir las pérdidas (Brooker et al., 2015; Cardinale et al., 2006). Esta estrategia incluye la mezcla de diferentes variedades en el mismo campo. Por ejemplo, en China, utilizando diversidad genética del cultivo de arroz, se han logrado reducir los brotes de piricularіosis (*Magnaporthe oryzae*) en un 94 %, e incrementar los rendimientos en un 89 %, en relación con el monocultivo (Zhu et al., 2000).

Al respecto, en Colombia, para el control de la roya del café, el Centro Nacional de Investigaciones de

Café (Cenicafé) desarrolló la variedad Colombia, que fue liberada en 1983 y sigue siendo resistente después de más de 30 años de haber sido entregada a los caficultores y sembrada comercialmente. Su logro se alcanzó mediante el uso de la diversidad genética como estrategia de resistencia durable de tipo multilineal. En este caso, cuando alguna raza del patógeno ataca uno o varios componentes de dicha variedad multilineal, los otros permanecen sanos, pues tienen factores de resistencia no compatibles con la nueva raza del patógeno. Esta variedad multilineal también ofrece otro factor de protección, ya que actúa como barrera frente a la dispersión de la roya, "diluyendo" su ataque. De esta manera, plantas susceptibles a la enfermedad pueden permanecer con niveles bajos de infección, en medio de poblaciones resistentes (Moreno & Alvarado, 2000).

El cultivo simultáneo de múltiples especies se ha utilizado a lo largo de la historia y sigue siendo común entre los agricultores de pequeñas propiedades en los trópicos. Un beneficio de esta práctica es el control de las enfermedades. En una investigación fenomenológica de más de 200 estudios, al comparar la enfermedad en monocultivos y en cultivos intercalados, principalmente debido a hongos foliares, se concluyó que en cultivos intercalados se redujeron las enfermedades en un 73 %. Los mecanismos por los cuales los cultivos asociados afectan la dinámica de estas enfermedades incluyen la alteración del viento, la lluvia y la dispersión de los vectores; la modificación del microclima, especialmente de la temperatura y humedad; cambios en la morfología y fisiología del huésped; la inhibición directa de patógenos, y la perturbación de los procesos de diseminación del inóculo entre plantas. La comprensión de todos los mecanismos que llevan a la reducción de las enfermedades y sus interacciones permitirá mejorar el sistema de cultivos asociados para que no solo sea usado por pequeños productores, sino también por agricultores industriales (Boudreau, 2013).

En las comunidades naturales, las enfermedades están limitadas en parte por la diversidad de especies (Burdon, Thrall, & Ericson, 2006; Knops et al., 2002). Vandermeer (1992), en su libro sobre la ecología de los cultivos intercalados, menciona más de 57 combinaciones, lo que refleja la gran diversidad de sistemas utilizados que tienen lugar principalmente en los trópicos, en donde los cultivos asociados son el método preferido entre los pequeños productores (Lithourgidis, Dordas, Damalas, & Vlachostergios, 2011). Si los cultivos asociados son un medio efectivo de supresión de enfermedades, como lo sugieren y demuestran numerosos estudios —y estamos satisfechos de que sea tan sostenible y ampliamente aplicable—, entonces se esperaría una mayor adopción, que no necesariamente ha sucedido a gran escala (Boudreau, 2013). Popularizar esta práctica depende de los científicos, quienes deben descubrir y comprender la naturaleza precisa de esta herramienta subutilizada, y de los transferidores que deben ofrecerla a los agricultores, demostrándole sus beneficios.

Rotación de cultivos

La rotación de cultivos es una práctica eficaz para controlar las enfermedades de las plantas (Walker, 1969). Los patógenos fúngicos y bacterianos que pueden sobrevivir solo en los residuos de cosecha son los más adecuados para su manejo mediante la rotación de cultivos, porque pueden sobrevivir en ausencia de las plantas hospedantes y cuando los desechos ya se hayan descompuesto. Los organismos visitantes por corto plazo se llaman "invasores" o "patógenos transitorios del suelo", y varían en el período de tiempo en el que pueden sobrevivir; por lo tanto, su control depende del número de rotaciones y de su duración (McGrath, 2012).

Si se asume lo demostrado por varios autores, en el sentido de que el cultivo repetido de una misma especie vegetal permite la acumulación de fitopatógenos, las rotaciones permitirían la reducción del inóculo patogénico o de su actividad. Por ejemplo, el monocultivo de fríjol repetido resultó en brotes severos de pudrición de la raíz causada por *Fusarium* en Estados Unidos (Burke & Kraft, 1974; Snyder, Schroth, & Christou, 1959). Asimismo, Burke y Kraft (1974) señalaron que la incidencia de pudrición de la raíz y el volcamiento causados por *Fusarium* y *Pythium* era alta en un campo cuando el fríjol se plantó continuamente durante 15 años, mientras que estas dos enfermedades no se detectaron en un campo cercano, donde el fríjol nunca se había

cultivado previamente. En estudios posteriores, se demostró un aumento de la bacteria biocontroladora *Pseudomonas* sp. en suelos que habían rotado, en los que hubo control de las mencionadas enfermedades, demostrándose una relación entre la rotación y la supresividad observada en campo (Huang, Kodama, Akashi, & Konno, 2002).

La rotación de cultivos, además de afectar las comunidades microbianas asociadas a las plantas, también afecta la estructura y la dinámica del suelo. Por otra parte, los microorganismos responden a la genética de la planta huésped, a las características del suelo y a las condiciones climáticas (Garbeva, Van Veen, & Van Elsas, 2004; Lehman et al., 2015). Las especies microbianas que viven muy cerca de o en asociación con las plantas están directamente influenciadas por la arquitectura de la raíz, así como por las características químicas de sus exudados (Berg & Smalla, 2009).

La rizosfera alberga un número elevado de microorganismos activos en comparación con el resto del suelo, incluidos los patógenos, los microorganismos benéficos y los saprótrofos (Philippot, Raaijmakers, Lemanceau, & Van der Putten, 2013; Schippers, Bakker, & Bakker, 1987). Dichos microorganismos benéficos pueden promover la salud y el crecimiento de las plantas a través de diferentes mecanismos que incluyen la producción de análogos de las hormonas vegetales; la estimulación de respuestas de resistencia sistémica contra fitopatógenos y otras plagas; actividad biocontroladora directa contra los patógenos, y la movilización y solubilización de nutrientes requeridos por la planta (Compant, Duffy, Nowak, Clément, & Barka, 2005). En un estudio desarrollado por Dias, Dukes y Antunes (2014), se demostró que la rotación de cultivos diversifica y beneficia las especies presentes en el suelo, mediante el enriquecimiento de taxones microbianos que promueven el crecimiento de los cultivos.

Control cultural, mecánico, físico y óptico

Antes de establecer el cultivo, es primordial asegurar que el área geográfica sea adecuada, con base en la calidad del suelo y en la idoneidad del clima, pero debe considerarse que en muchos casos el clima idóneo para el cultivo puede también ser adecuado para el desarrollo del patógeno. Por ejemplo, la antracnosis de fríjol es de común ocurrencia en áreas húmedas, por lo que se recomienda plantarlo en zonas secas (Razdan & Sabitha, 2009).

Las prácticas de control cultural tienen como objetivo reducir el inóculo inicial o reducir la tasa de progreso de la enfermedad, mediante la modificación del ambiente de cultivo. Muchas prácticas ayudan a reducir la incidencia y la severidad de las enfermedades. Estas prácticas incluyen la selección de materiales de siembra libres de patógenos; la orientación de la siembra para mejorar la exposición a los rayos solares y reducir las corrientes de aire; las podas y el raleo, para eliminar las fuentes de infección y mejorar la aireación dentro y alrededor de plantas susceptibles; la nutrición adecuada, un método de cultivo apropiado para mejorar el crecimiento de las raíces y evitar daños a las plantas, y el uso de procedimientos sanitarios para eliminar las fuentes de inóculo y el manejo del agua tanto en la planta como en el suelo (Maloy, 2005).

Por ejemplo, el uso de riego por goteo en lugar de riego por aspersión permite reducir el agua libre en el follaje, que propicia el desarrollo de patógenos foliares (Paret et al., 2015), y la humedad alta del suelo promueve el desarrollo de patógenos oomycetes tales *Phytophthora* spp. (Loyd, Benson & Ivors, 2014); además, el agua de riego puede contener propágulos de estos patógenos (Sánchez & Gallego, 2001). El exceso de agua daña las raíces al privarlas de oxígeno y crea condiciones que favorecen la infección por ciertos patógenos del suelo. El manejo del riego basado en las necesidades de la planta puede crear un ambiente desfavorable para la supervivencia del patógeno y para el desarrollo de la enfermedad. Evitar áreas bajas y usar tensiómetros u otros dispositivos para programar el riego también ayuda a controlar la enfermedad (Zotarelli, Dukes, Liu, Simonne, & Agehara, 2017).

Asimismo, la nutrición de las plantas puede reducir algunas enfermedades; verbigracia, los fertilizantes con mayor proporción de nitratos (NO_3) que de nitrógeno amoniacal (NH_4) ayudan a reducir la incidencia de la marchitez por *Fusarium oxysporum*

en el tomate (Woltz & Jones, 1973). La tolerancia del arroz a la piriculariosis, al tizón de la vaina, a la mancha marrón y a la podredumbre del tallo se correlacionan con un alto contenido de silicio en los tejidos vegetales (Savant, Snyder, & Datnoff, 1996). El alto contenido de Ca en los tejidos se correlaciona con la resistencia a las enfermedades causadas por *Erwinia carotovora*, *Fusarium solani*, *Pythium myriotylum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia minor* y *Sclerotium rolfsii* (Bateman & Basham, 1976; Huber, 1994; Kelman, McGuire, & Tzeng, 1989). Por otra parte, el aumento del pH del suelo a 7, mediante la adición de montmorillonita o illita, en cultivos de lino, incrementó significativamente el grado de supresividad del suelo contra el marchitamiento producido por *Fusarium oxysporum* (Höper, Steinberg, & Alabouvette, 1995).

La labranza es el principal medio de perturbación en los agroecosistemas, y es fundamental para muchas prácticas agrícolas, como la preparación de semilleros y la incorporación de fertilizantes, así como para la supresión de malezas, de algunas enfermedades y de insectos plaga (Gebhardt, Daniel, Schweizer, & Allmaras, 1985). Se ha demostrado que la combinación adecuada de sistemas de labranza y cultivos puede favorecer el desarrollo de microorganismos benéficos, evitando la propagación de patógenos fúngicos (Gil et al., 2008). Asimismo, la combinación de labranza con rotación de cultivos también puede ser utilizada para el control de algunas enfermedades (Cotuna, Paraschivu, Paraschivu, & Sărățeanu, 2015).

Además, se debe tener en cuenta que el movimiento del suelo de un sitio a otro puede propagar enfermedades, al facilitar la diseminación de patógenos. Por ejemplo, los esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotium rolfsii* se transportan fácilmente desde suelos contaminados. Dependiendo de los cultivos y de otros factores, el saneamiento del suelo se puede lograr en cierta medida mediante la solarización (Liu, Simonne, Morgan, & Hochmuth, 2015).

Las coberturas de polietileno se pueden usar como una barrera física entre el suelo y las partes de la planta que están en contacto con la superficie. Los acolchados altamente reflectantes de luz ultravioleta (metalizados) repelen algunos insectos vectores de virus, tales como trips y moscas blancas (Hochmuth & Sprenkel, 2008).

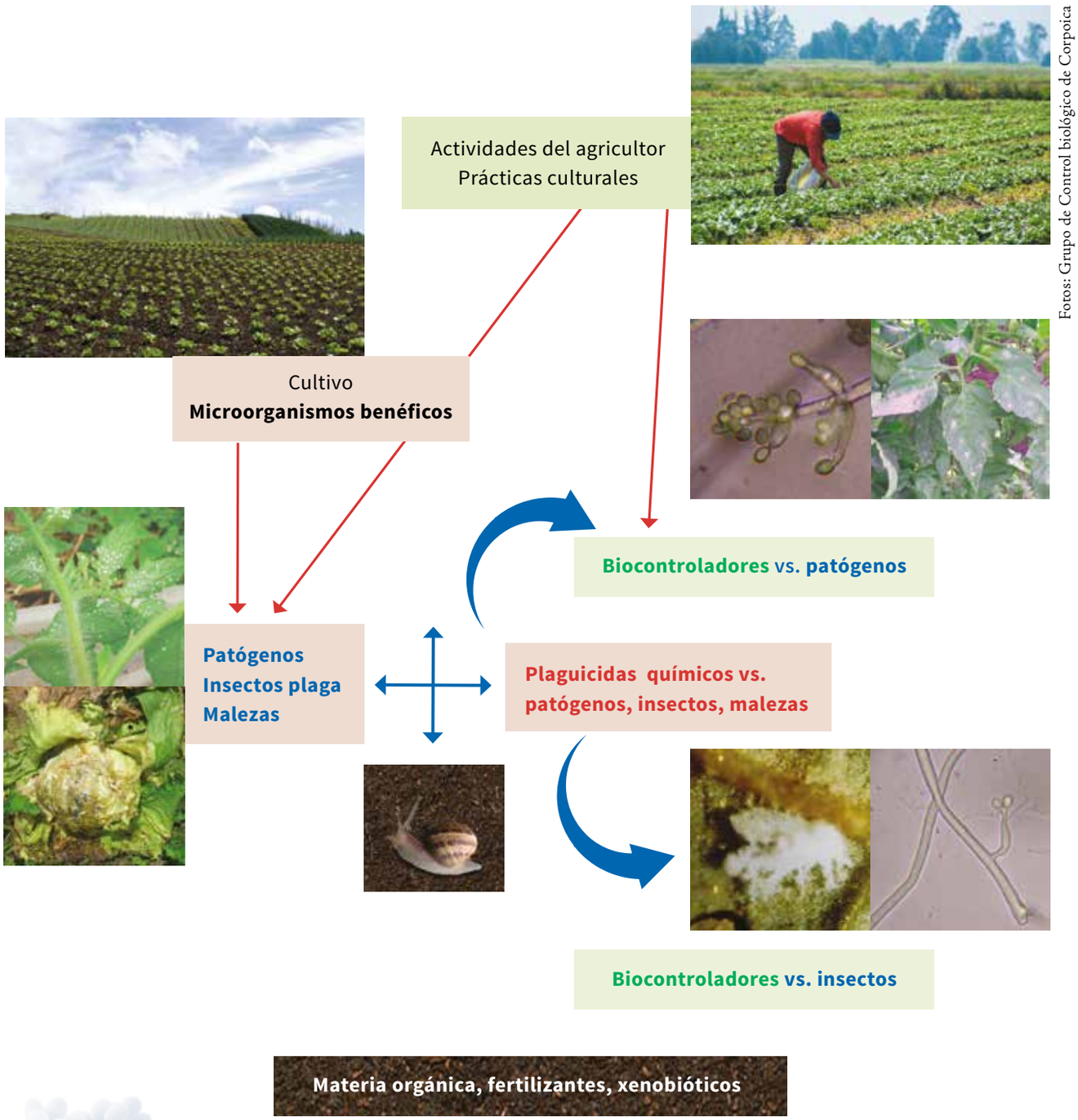
Implementación del manejo integrado de enfermedades

El MIE, en general, exige alto nivel de conocimiento, experiencia y destreza, y su aplicación, en particular, exige información confiable sobre las características del sitio en que se va a usar. Su éxito en gran parte depende de que los agricultores y extensionistas entiendan los procesos agroecológicos que afectan la enfermedad y, en consecuencia, tomen decisiones informadas sobre la mejor forma de manejar los cultivos para evitar y prevenir la aparición de la enfermedad, así como la forma de manejarla cuando esta ya representa un problema. Por esta razón, el MIE requiere de un alto nivel de capacidad analítica y es intensivo en capacitación para el monitoreo de cultivos y sobre los principios ecológicos que lo fundamentan (Van de Fliert, Asmunati, & Tantowijoyo, 2000).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) establece unas recomendaciones básicas que deben considerarse dentro de programas de MIE (insectos y fitopatógenos). Estas incluyen: 1) uso de cultivares y variedades resistentes, rotación de cultivos, y asociaciones y prácticas culturales que minimicen la presión de las plagas y maximicen su prevención por medios biológicos; 2) realizar una evaluación regular y cuantitativa del estado de equilibrio entre insectos plaga y enfermedades, y organismos benéficos en el cultivo; 3) aplicar técnicas de pronóstico de insectos plaga y enfermedades; 4) comprender y usar prácticas no químicas de manejo de plagas; 5) decidir sobre las intervenciones que se harán en el cultivo, minimizando el uso de agroquímicos, luego de considerar todos los métodos posibles y sus efectos sobre la productividad agrícola a corto y largo plazo, teniendo en cuenta las implicaciones ambientales; 7) almacenar y usar los agroquímicos de acuerdo con los requisitos legales, manteniendo registros precisos de su uso (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 2018).

En el caso de enfermedades, el conocimiento de la biología del patógeno y la epidemiología de la enfermedad es crucial para el desarrollo de una estrategia de control biológico apropiada y su integración en un programa MIE.

Del mismo modo, elucidar los factores bióticos y abióticos que influyen en el desarrollo de la enfermedad es indispensable para definir el programa de manejo. Deben también considerarse las susceptibilidades e interacciones de todas las prácticas del cultivo, con el agente de control biológico, ya que este puede verse afectado, por los diferentes agroquímicos utilizados para diferentes propósitos (plaguicidas, fertilizantes, herbicidas), por prácticas de manejo del cultivo, por las condiciones ambientales, por otros biocontroladores usados para el manejo de otras enfermedades o insectos plaga presentes en el cultivo, y por la presencia de diferentes plagas (fitopatógenos, insectos, malezas) (figura 17.4).



Fotos: Grupo de Control biológico de Corpoica

Figura 17.4. Factores que pueden afectar la actividad de los biocontroladores.

Fuente: Elaboración propia

El uso del control biológico y la implementación de prácticas culturales como medidas independientes para el manejo de enfermedades no siempre son suficientes. Un ejemplo es el manejo del moho gris, producido por *Botrytis cinerea*, en el que la integración de medidas de control biológico con agentes de control químico ha demostrado ser efectiva.

Shtienberg (2007) desarrolló un programa de manejo integrado, logrando una reducción significativa en el uso de fungicidas, sin aumentar los riesgos de brotes de *Botrytis*; concluyó que el manejo racional de la enfermedad es factible mediante componentes no químicos respaldados por unas pocas aplicaciones de fungicidas programadas adecuadamente. Esto fue posible gracias al desarrollo de los métodos de manejo integrado de *Botrytis* llamado "Botman" (sistema de alerta) (Shtienberg & Elad, 1997) y el programa de manejo de enfermedades bajo invernadero llamado "Greenman" (Elad & Shtienberg, 1997).

En estos sistemas, se utilizó como elemento central el control biológico mediante la cepa T39 de *Trichoderma harzianum*, lográndose optimizar el uso de fungicidas, ya que se disminuyó en dos tercios, se limitó el desarrollo de poblaciones resistentes de *Botrytis* y se logró el mismo control de la enfermedad que se obtuvo con un programa basado solamente en el uso de fungicidas químicos. Botman se comparó con la aplicación semanal de fungicidas en 11 experimentos realizados durante tres años en tomate y pepino cultivados en invernadero. La reducción de la enfermedad en parcelas manejadas de acuerdo con las recomendaciones de Botman no difirió significativamente de la observada en parcelas manejadas únicamente con fungicidas (aplicación semanal de fungicidas), pero el número de aplicaciones de fungicidas en las parcelas Botman fue de 4,2, comparado con 10,5 aplicaciones en el manejo exclusivo con fungicidas. La estrategia integrada condujo a la aplicación promedio de 5,9 aplicaciones de *T. harzianum* (T39) (Shtienberg, 2007).

Consideraciones finales y conclusiones

La agricultura orgánica se practica en 179 países y 43,7 millones de hectáreas de tierras agrícolas son manejadas orgánicamente por aproximadamente 2,3 millones de agricultores. Las ventas mundiales de alimentos y bebidas orgánicas alcanzaron 80.000 millones de dólares en el 2014. Las ventas mundiales de productos orgánicos han aumentado aproximadamente en 20 % por año, con el 97 % de ese mercado en América del Norte y Europa (Davidson, 2005). Sin embargo, en general la producción orgánica todavía representa una pequeña fracción de las ventas agrícolas totales, aunque se esté presentando un crecimiento importante; si se tiene en cuenta que solo en Europa se produjo un crecimiento del 13 % en el 2015 y en el 2016, la mayoría de los países europeos, experimentaron un crecimiento superior al 10 % (Willer & Lernoud, 2017). A pesar de este progreso, los plaguicidas de síntesis siguen siendo utilizados en la gran mayoría de la producción agrícola y representan un factor crítico, por lo que es justamente en este segmento en el que el MIP puede jugar un papel decisivo en la reducción de los riesgos inherentes al uso de agroquímicos en todo el mundo. El uso del control biológico en los sistemas de manejo de plagas ha tenido una larga y rica historia y, aunque presentan varios factores que no han permitido una mayor adopción, en la actualidad existen muchas oportunidades para el uso continuado de bioplaguicidas en programas MIP. El MIP evoluciona hacia prácticas más ecológicas (Koul & Cuperus, 2007); el control biológico que probablemente tiene la mayor oportunidad para expandirse es el control biológico de conservación, que se obtiene gracias al manejo de las interacciones del agroecosistema para potenciar la eficacia de los enemigos naturales autóctonos y, de esta forma, prevenir el ataque a niveles de daño económico de las plagas. La agricultura en su conjunto se enfrenta a una variedad de cambios desafiantes. El cambio climático está comenzando a afectar los sistemas agrícolas en todo el mundo y el control biológico deberá adaptarse a estos cambios (Hance, Van Baaren, Vernon, & Boivin, 2007; Stacey, 2003).

Los cambios en las tácticas de manejo de plagas son el resultado de una variedad de factores, incluyendo preocupaciones ambientales y de seguridad humana, desarrollo de resistencia a los plaguicidas químicos, aumento del costo y de la disponibilidad de los plaguicidas y, por supuesto demanda de mercado. Los consumidores se están convirtiendo en una fuerza motriz para orientar las prácticas de manejo de plagas (fitopatógenos e insectos). Tanto las tiendas de grandes superficies como los minoristas están pidiendo estándares cada vez más exigentes de prácticas agrícolas limpias por parte de los agricultores, mientras que la opinión pública sobre los efectos negativos de los plaguicidas también está exigiendo uso reducido de plaguicidas (Dent, 2005; Warner, 2006).

El MIP tiene la capacidad de permitir una producción eficiente y sostenible de alimentos inocuos, para satisfacer las necesidades de la creciente población mundial, y de reemplazar una gran proporción de los plaguicidas tóxicos actualmente usados. Sin embargo, esto no puede verse en el contexto único de un problema fitosanitario, sino que debe aproximarse al desarrollo de programas de manejo integrado de cultivos, en los que se logre un manejo eficiente de las diferentes plagas (fitopatógenos e insectos que lo afectan), al mismo tiempo que se utilicen programas de fertilización y riego adecuados, considerando la sostenibilidad ambiental. Dada la gran cantidad de preguntas abiertas en relación con los componentes efectivos del MIP y sus interacciones, los investigadores tienen la gran responsabilidad de abordar los complejos problemas científicos que deben resolverse para desarrollar todo su potencial. La integración de las acciones dentro del dominio ecológico requerirá del desarrollo de nuevas investigaciones básicas y aplicadas, a cargo de grupos multidisciplinarios, en las que no solo se analicen los componentes individuales, sino los numerosos efectos sinérgicos que aumentarán la sostenibilidad de la agricultura.

Agradecimientos

Los autores agradecen a sus instituciones: AGROSAVIA (anteriormente Corpoica) y Volcani Center, por su apoyo incondicional, que les ha permitido avanzar en el conocimiento científico y en la implementación de las soluciones tecnológicas desarrolladas. También les agradecen a sus grupos de trabajo por su compromiso y valiosos aportes.

Referencias

Abo-Elyousr, K. A. M., Ibrahim, Y. E., & Balabel, N. M. (2012). Induction of disease defensive enzymes in response to treatment with acibenzolar-S-methyl (ASM) and *Pseudomonas fluorescens* Pf2 and inoculation with *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2 (phylotype II). *Journal of Phytopathology*, *160*(7-8), 382-389. doi:10.1111/j.1439-0434.2012.01915.x.

Ahmad, S., Gordon-Weeks, R., Pickett, J., & Ton, J. (2010). Natural variation in priming of basal resistance: from evolutionary origin to agricultural exploitation. *Molecular Plant Pathology*, *11*(6), 817-827. doi:10.1111/j.1364-3703.2010.00645.x.

Andow, D. (1983). The extent of monoculture and its effects on insect pest populations with particular reference to wheat and cotton. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *9*(1), 25-35. doi:10.1016/0167-8809(83)90003-8.

Ayliffe, M., Singh, R., & Lagudah, E. (2008). Durable resistance to wheat stem rust needed. *Current Opinion in Plant Biology*, *11*(2), 187-192. doi:10.1016/j.pbi.2008.02.001.

Balmer, A., Pastor, V., Gamir, J., Flors, V., & Mauch-Mani, B. (2015). The *'prime-ome'*: towards a holistic approach to priming. *Trends in Plant Science*, *20*(7), 443-452. doi:10.1016/j.tplants.2015.04.002

Bardgett, R. (2005). *The biology of soil: a community and ecosystem approach*. Nueva York, EE. UU.: Oxford University.

Bateman, D. F., & Basham, H. G. (1976). Degradation of plant cell walls and membranes by microbial enzymes. En R. Heitefuss & P. H., Williams (Eds.), *Physiological plant pathology* (pp. 316-355). Berlín, Alemania: Springer. doi:10.1007/978-3-642-66279-9_13.

Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., & Bakker, P. A. H. M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, *17*(8), 478-486. doi:10.1016/j.tplants.2012.04.001.

Berg, G., Grube, M., Schloter, M., & Smalla, K. (2014a). The plant microbiome and its importance for plant and human health. *Frontiers in Microbiology*, *5*, 491. doi.10.3389/fmicb.2014.00491.

Berg, G., Grube, M., Schloter, M., & Smalla, K. (2014b). Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, *5*, 777-780. doi:10.3389/fmicb.2014.00148.

Berg, G., Rybakova, D., Grube, M., & Koberl, M. (2016). The plant microbiome explored: implications for experimental botany. *Journal of Experimental Botany*, *67*(4), 995-1002. doi:10.1093/jxb/erv466.

Berg, G., & Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, *68*(1), 1-13. doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x.

Bhattarai, A., Bhattarai, B., & Pandey, S. (2015). Variation of soil microbial population in different soil horizons. *Journal of Microbiology*, *2*(2), 00044. doi:10.15406/jmen.2015.02.00044.

Blagodatskaya, E. & Kuzyakov, Y. (2013). Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches. *Soil Biology and Biochemistry*, *67*, 192-211. doi:10.1016/j.soilbio.2013.08.024.

Booth, A. (2014). Symbiosis, selection, and individuality. *Biology & Philosophy*, *29*(5), 657-673. doi:10.1007/s10539-014-9449-8.

Bordenstein, S. R., & Theis, K. R. (2015). Host biology in light of the microbiome: Ten principles of holobionts and hologenomes. *PLoS Biol*, *13*(8), e1002226. doi:10.1371/journal.pbio.1002226.

Boudreau, M. A. (2013). Diseases in intercropping systems. *Annual Review of Phytopathology*, *51*, 499-519. doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102246.

Brooker, R. W., Karley, A. J., Newton, A. C., Pakeman, R. J., Schöb, C., & Pugnaire, F. (2015). Facilitation and sustainable agriculture: a mechanistic approach to reconciling crop production and conservation. *Functional Ecology*, *30*(1), 98-107. doi:10.1111/1365-2435.12496.

Burdon, J. J., Thrall, P. H., & Ericson, L. (2006). The current and future dynamics of disease in plant communities. *Annual Review of Phytopathology*, *44*, 19-39. doi:10.1146/annurev.phyto.43.040204.140238.

Burke, D., & Kraft, J. (1974). Responses of beans and peas to root pathogens accumulated during monoculture of each crop species. *Phytopathology*, *64*, 546-549.

Cardinale, B. J., Srivastava, D. S., Emmett Duffy, J., Wright, J. P., Downing, A. L., ... Jouseau, C. (2006). Effects of biodiversity on the functioning of trophic groups and ecosystems. *Nature*, *443*, 989-992. doi:10.1038/nature05202.

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(9), 4951-4959. doi:10.1128/aem.71.9.4951-4959.2005.

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*: 259-264.

Cotuna, O., Paraschivu, M., Paraschivu, A., & Sărățeanu, V. (2015). The influence of tillage, crop rotation and residue management on tan spot (*Drechslera tritici-repentis*. Died. Shoemaker) in winter wheat. *Research Journal of Agricultural Science*, *47*(2), 13-21.

Chen, Y. H., Gols, R., Stratton, C. A., Brevik, K. A., & Benrey, B. (2015). Complex tritrophic interactions in response to crop domestication: predictions from the wild. *Entomology Experimentalis et Applicata*, *157*(1), 40-59. doi:10.1111/eea.12344.

Da Rocha, A. B. & Hammerschmidt, R. (2005). History and perspectives on the use of disease resistance inducers in horticultural crops. *HortTechnology*, *15*(3), 518-529.

Davidson, S. (2005). Going organic. *Ecos*, *127*, 8-12.

De Nobili, M., Contin, M., Mondini, C., & Brookes, P. C. (2001). Soil microbial biomass is triggered into activity by trace amounts of substrate. *Soil Biology and Biochemistry*, *33*(9), 1163-1170. doi:10.1016/S0038-0717(01)00020-7.

De Vrese, M., & Schrezenmeir, J. (2008). Probiotics, prebiotics, and synbiotics. En U. Stahl, U. E. B. Donalies, & E. Nevoigt (Eds.), *Food Biotechnol* (pp. 1-66). Berlín, Alemania: Springer. doi:10.1007/10_2008_097.

De Vries, F. T., Thébault, E., Liiri, M., Birkhofer, K., Tsiafouli, M. A., Bjørnlund, L., ... Bardgett, R. D. (2013). Soil food web properties explain ecosystem services across European land use systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(35), 14296-14301. doi:10.1073/pnas.1305198110.

Delmas, C., Fabre, F., Jolivet, J., Mazet, I. D., Richart S., Delière, L., & Delmotte, F. (2016). Adaptation of a plant pathogen to partial host resistance: selection for greater aggressiveness in grapevine downy mildew. *Evolutionary Applications*, *9*(5), 709-725. doi:10.1111/eva.12368.

Dent, D. (2000). *Insect pest management*. Massachusetts, EE. UU.: CABI.

Dent, D. (2005). Overview of agrobiologicals and alternatives to synthetic pesticides. En J. N. Pretty (Ed.), *The pesticide detox: Towards a more sustainable agriculture* (pp. 70-82). Londres, Inglaterra: Earthscan Publications Ltd.

Dias, T., Dukes, A., & Antunes, P. M. (2014). Accounting for soil biotic effects on soil health and crop productivity in the design of crop rotations. *Journal of Science of Food and Agriculture*, *95*(3), 447-454. doi:10.1002/jsfa.6565.

Elad, Y., David, D. R., Harel, Y. M., Borenshtein, M., Kalifa, H. B., Silber, A., & Graber, E. R. (2010). Induction of systemic resistance in plants by biochar, a soil-applied carbon sequestering agent. *Phytopathology*, *100*(9), 913-921. doi:10.1094/PHYTO-100-9-0913.

Elad, Y., & Shtienberg, D. (1997). Integrated management of foliar diseases in greenhouse vegetables according to principles of a decision support system Greenman. *IOBC WPRS Bulletin*, *20*(4), 71-76.

Fierer, N., Strickland, M. S., Liptzin, D., Bradford, M. A., & Cleveland, C. C. (2009). Global patterns in belowground communities. *Ecology Letters*, *12*(11), 1238-1249. doi:10.1111/j.1461-0248.2009.01360.x.

Garbeva, P., Van Veen, J. A., & Van Elsas, J. D. (2004). Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*, *42*, 243-270. doi:10.1146/annurev.phyto.42.012604.135455.

Gassmann, A. J., Petzold-Maxwell, J. L., Clifton, E. H., Dunbar, M. W., Hoffmann, A. M., Ingber, D. A., & Keweshan, R. S. (2014). Field-evolved resistance by western corn rootworm to multiple *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(14), 5141-5146. doi:10.1073/pnas.1317179111.

Gebhardt, M. R., Daniel, T. C., Schweizer, E. E., & Allmaras, R. R. (1985). Conservation tillage. *Science*, *230*(4726), 625-630. doi:10.1126/science.230.4726.625.

Gil, S. V., Pedelini, R., Oddino, C., Zuza, M., Marinelli, A., & March, G. J. (2008). The role of potential biocontrol agents in the management of peanut root rot in Argentina. *Journal of Plant Pathology*, *90*(1), 35-41.

Goellner, K., & Conrath, U. (2008). Priming: it's all the world to induced disease resistance. *European Journal of Plant Pathology*, *121*(3), 233-242. doi:10.1007/s10658-007-9251-4.

Gould, F., Kennedy, G. G., & Johnson, M. T. (1991). Effects of natural enemies on the rate of herbivore adaptation to resistant host plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *58*(1), 1-14. doi:10.1111/j.1570-7458.1991.tb01445.x.

Guerrero, R., Margulis, L., & Berlanga, M. (2013). Symbiogenesis: the holobiont as a unit of evolution. *International Microbiology*, *16*, 133-143. doi:10.2436/20.1501.01.188.

Hance, T., Van Baaren, J., Vernon, P., & Boivin, G. (2007). Impact of extreme temperatures on parasitoids in a climate change perspective. *Annual Review of Entomology*, *52*, 107-126. doi:10.1146/annurev.ento.52.110405.091333.

Helgason, T., Daniell, T. J., Husband, R., Fitter, A. H., & Young, J. P. W. (1998). Ploughing up the wood-wide web? *Nature*, *394*(6692), 431. doi:10.1038/28764.

Herms, D. A., & Mattson, W. J. (1992). The dilemma of plants: To grow or defend. *The Quarterly Review of Biology*, *67*(3), 283-335. doi:10.1086/417659.

Hochmuth, R., & Sprenkel, R. (2008). *Exclusion methods for managing greenhouse vegetable pests*. ENY-846 (IN730). Gainesville, EE. UU.: University of Florida.

Höper, H., Steinberg, C., & Alabouvette, C. (1995). Involvement of clay type and pH in the mechanisms of soil suppressiveness to Fusarium wilt of flax. *Soil Biology and Biochemistry*, *27*(7), 955-967. doi:10.1016/0038-0717(94)00238-V.

Hu, J., Wei, Z., Friman, V.-P., Gu, S.-h., Wang, X.-f., Eisenhauer, N., ... Jousset, A. (2016). Probiotic diversity enhances rhizosphere microbiome function and plant disease suppression. *mBio*, *7*(8), e01790-16. doi:10.1128/mBio.01790-16.

Huang, H. C., Kodama, F., Akashi, K., & Konno, K. (2002). Impact of crop rotation on soilborne diseases and yield of kidney bean: A case study in northern Japan. *Plant Pathology Bulletin*, *11*, 87-96.

Huber, D. (1994). The influence of mineral nutrition on vegetable diseases. *Horticultura Brasileira*, *12*, 206-220.

Jacqmin, B., Cotes, A., 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 (Rijksuniversiteit te Gent)*, *58*(3b), 1321-1328.

Johnsen, K., Jacobsen, C. S., Torsvik, V., & Sørensen, J. (2001). Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils – a review. *Biology and Fertility Soils*, *33*(6), 443-453. doi:10.1007/s003740100351.

Katz, V. A., Thulke, O. U., & Conrath, U. (1998). A benzothiadiazole primes parsley cells for augmented elicitation of defense responses. *Plant Physiology*, *117*, 1333-1339. doi:10.1104/pp.117.4.1333.

Kauss, H., Theisinger-Hinkel, E., Mindermann, R., & Conrath, U. (1992). Dichloroisonicotinic and salicylic acid, inducers of systemic acquired resistance, enhance fungal elicitor responses in parsley cells. *The Plant Journal*, *2*(5), 655-660. doi:10.1111/j.1365-313X.1992.tb00134.x.

Kelman, A., McGuire, R., & Tzeng, K. (1989). Reducing the severity of bacterial soft rot by increasing the concentration of calcium in potato tubers. En A. W. Engelhard (Ed.), *Soilborne plant pathogens: management of diseases with macro- and microelements* (pp. 102-123). Saint Paul, Minnesota, EE. UU.: APS Press.

Kessler, A., & Ian, T. B. (2004). Herbivore-induced plant vaccination. Part I. The orchestration of plant defenses in nature and their fitness consequences in the wild tobacco *Nicotiana attenuata*. *The Plant Journal*, *38*(4), 639-649. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02076.x.

Klein, E., Ofek, M., Katan, J., Minz, D., & Gamliel, A. (2012). Soil suppressiveness to *Fusarium* disease: Shifts in root microbiome associated with reduction of pathogen root colonization. *Phytopathology*, *103*(1), 23-33. doi:10.1094/PHYTO-12-11-0349.

Knops, J. M. H., Tilman, D., Haddad, N. M., Naeem, S., Mitchell, C. E., Haarstad, J., ... Groth, J. (2002). Effects of plant species richness on invasion dynamics, disease outbreaks, insect abundances and diversity. *Ecology Letters*, *2*(5), 286-293. doi:10.1046/j.1461-0248.1999.00083.x.

Koul, O., & Cuperus, G. W. (2007). *Ecologically based integrated pest management*. Wallingford, Inglaterra: CABI Publishing.

Kuć, J. (1982). Induced immunity to plant disease. *Bioscience*, *32*(11), 854-860. doi:10.2307/1309008.

Lehman, R., Cambardella, C., Stott, D., Acosta-Martinez, V., Manter, D., Buyer, J., ... Karlen, D. (2015). Understanding and enhancing soil biological health: The solution for reversing soil degradation. *Sustainability*, *7*(1), 1-40.

Lithourgidis, A. S., Dordas, C. A., Damalas, C. A., & Vlachostergios, D. N. (2011). Annual intercrops: an alternative pathway for sustainable agriculture. *Australian Journal of Crop Science*, *5*(4), 396-410.

Liu, G. D., Simonne, E. H., Morgan, T. K., & Hochmuth, J. G. (2015). *Soil and fertilizer management for vegetable production in Florida*. Gainesville, EE. UU.: UF/IFAS Extension University of Florida.

Liu, X., Chen, M., Collins, H. L., Onstad, D. W., Roush, R. T., Zhang, Q., ... Shelton, A. M. (2014). Natural enemies delay insect resistance to -bt crops. *PLoS One*, *9*(3), e90366. doi:10.1371/journal.pone.0090366.

Locey, K. J., & Lennon, J. T. (2016). Scaling laws predict global microbial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 113*(21), 5970-5975. doi:10.1073/pnas.1521291113.

Loyd, A. L., Benson, D. M., & Ivors, K. L. (2014). *Phytophthora* populations in nursery irrigation water in relationship to pathogenicity and infection frequency of *Rhododendron* and *Pieris*. *Plant Disease, 98*(9), 1213-1220. doi:10.1094/PDIS-11-13-1157-RE.

Luna, E., Bruce, T. J. A., Roberts, M. R., Flors, V., & Ton, J. (2012). Next-generation systemic acquired resistance. *Plant Physiology, 158*(2), 844-853. doi:10.1104/pp.111.187468.

Lyon, G. (2007). Agents That Can Elicit Induced Resistance. En D. R. Walters, A. Newton, & G. Lyon (Eds.), *Induced resistance for plant disease control: A sustainable approach to crop protection* (pp. 9-29). Oxford, Inglaterra: Blackwell Publishing. doi:10.1002/9781118371848.ch2.

Maloy, O. C. (2005). Plant Disease Management. *The Plant Health Instructor*. doi.10.1094/PHI-I-2005-0202-01.

Martinez-Medina, A., Flors, V., Heil, M., Mauch-Mani, B., Pieterse, C.M.J., Pozo, M.J., ... Conrath, U. (2016). Recognizing plant defense priming. *Trends in Plant Science, 21*(10), 818-822. doi.10.1016/j.tplants.2016.07.009.

Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E., & Flors, V. (2017). Defense priming: An adaptive part of induced resistance. *Annual Review of Plant Biology, 68*, 485-512. doi:10.1146/annurev-arplant-042916-041132.

McGrath, M. T. (2012). *Managing plant diseases with crop rotation*. Recuperado de https://www.sare.org/Learning-Center/Books/Crop-Rotation-on-Organic-Farms/Text-Version/Physical-and-Biological-Processes-In-Crop-Production/Managing-Plant-Diseases-With-Crop-Rotation.

Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Review, 37*(5), 634-663. doi:10.1111/1574-6976.12028.

Mendes, R., Kruijt, M., de Bruijn, I., Dekkers, E., Van der Voort, M., Schneider, J.H., ... Raaijmakers, J. M. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science, 332*(6033), 1097-1100. doi:10.1126/science.1203980.

Mitchell, C., Brennan, R. M., Graham, J., & Karley, A. J. (2016). Plant defense against herbivorous pests: Exploiting resistance and tolerance traits for sustainable crop protection. *Frontiers in Plant Science, 7*, 1132. doi:10.3389/fpls.2016.01132.

Mitter, B., Pfaffenbichler, N., Flavell, R., Compant, S., Antonielli, L., Petric, A., ... Sessitsch, A. (2017). A new approach to modify plant microbiomes and traits by introducing beneficial bacteria at flowering into progeny seeds. *Frontiers in Microbiology, 8*, 11. doi:10.3389/fmicb.2017.00011.

Moreno, C., Castillo, F., González, A., Bernal, D., Jaimes, Y., Chaparro, M., ... Cotes, A. (2009). Biological and molecular characterization of the response of tomato plants treated with *Trichoderma koningiopsis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology, 74*(2), 111-120. doi:10.1016/j.pmpp.2009.10.001.

Moreno, L. G., & Alvarado, G. (2000). *La Variedad Colombia: Veinte años de adopción y comportamiento frente a nuevas razas de la roya del cafeto*. Manizales, Colombia: Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé).

Moya-Elizondo, E. A., & Jacobsen, B. J. (2016). Integrated management of *Fusarium* crown rot of wheat using fungicide seed treatment, cultivar resistance, and induction of systemic acquired resistance (SAR). *Biological Control, 92*: 153-163. doi:10.1016/j.biocontrol.2015.10.006.

Muola, A., Weber, D., Malm, L. E., Egan, P. A., Glinwood, R., Parachnowitsch, A. L., & Stenberg, J. A. (2017). Direct and pollinator-mediated effects of herbivory on strawberry and the potential for improved resistance. *Frontiers in Plant Science, 8*, 823. doi:10.3389/fpls.2017.00823.

Myresiotis, C. K., Karaoglanidis, G. S., Vryzas, Z., & Papadopoulou-Mourkidou, E. (2012). Evaluation of plant-growth-promoting rhizobacteria, acibenzolar-S-methyl and hymexazol for integrated control of *Fusarium* crown and root rot on tomato. *Pest Management Science, 68*(3), 404-411. doi.10.1002/ps.2277.

Oostendorp, M., Kunz, W., Dietrich, B., & Staub, T. (2001). Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology, 107*(1), 19-28. doi:10.1023/A:1008760518772.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2018). *How to practice integrated pest management*. Recuperado de http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/spi/scpi-home/managing-ecosystems/integrated-pest-management/ipm-how/en/.

Orozco-Mosqueda, M. C., Rocha-Granados, M. C., Glick, B. R., & Santoyo, G. (2018). Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. *Microbiology Research, 208*, 25-31. doi:10.1016/j.micres.2018.01.005.

Paparella, S., Araújo, S. S., Rossi, G., Wijayasinghe, M., Carbonera, D., & Balestrazzi, A. (2015). Seed priming: state of the art and new perspectives. *Plant Cell Reports, 34*(8), 1281-1293. doi:10.1007/s00299-015-1784-y.

Paret, M., Dufault, N., Momol, T., Marois, J., & Olson, S. (2015). *Integrated disease management for vegetable crops in Florida*. Florida, EE. UU.: UF/IFAS Extension University of Florida.

Perazzolli, M., Roatti, B., Bozza, E., & Pertot, I. (2011). *Trichoderma harzianum* T39 induces resistance against downy mildew by priming for defense without costs for grapevine. *Biological Control, 58*(1), 74-82. doi:10.1016/j.biocontrol.2011.04.006.

Peshin, R., & Dhawan, A. K. (2009). *Integrated pest management. Volume 1: Innovation-development process.* Dordrecht, Holanda: Springer. doi:10.1007/978-1-4020-8992-3.

Peterson, J. A., Ode, P. J., Oliveira-Hofman, C., & Harwood, J. D. (2016). Integration of plant defense traits with biological control of arthropod pests: Challenges and opportunities. *Frontiers in Plant Science, 7,* 1794. doi:10.3389/fpls.2016.01794.

Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & Van der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology, 11,* 789-799. doi:10.1038/nrmicro3109.

Pieterse, C. M. J., de Jonge, R., & Berendsen, R. L. (2016). The Soil-Borne Supremacy. *Trends in Plant Science, 21*(3), 171-173. doi:10.1016/j.tplants.2016.01.018.

Pineda, A., Kaplan, I., & Bezemer, T. M. (2017). Steering soil microbiomes to suppress aboveground insect pests. *Trends in Plant Science, 22*(9), 770-778. doi:10.1016/j.tplants.2017.07.002.

Pinto, K. M. S., do Nascimento, L. C., de Souza-Gomes, E. C., da Silva, H. F., & dos Reis-Miranda, J. (2012). Efficiency of resistance elicitors in the management of grapevine downy mildew *Plasmopara viticola*: epidemiological, biochemical and economic aspects. *European Journal of Plant Pathology, 134*(4), 745-754. doi:10.1007/s10658-012-0050-1.

Postma, J., Scheper, R. W. A., & Schilder, M. T. (2010). Effect of successive cauliflower plantings and *Rhizoctonia solani* AG 2-1 inoculations on disease suppressiveness of a suppressive and a conducive soil. *Soil Biology and Biochemistry, 42*(5), 804-812. doi:10.1016/j.soilbio.2010.01.017.

Pushpalatha, H. G., Sudisha, J., Geetha, N. P., Amruthesh, K. N., & Shekar-Shetty, H. (2011). Thiamine seed treatment enhances LOX expression, promotes growth and induces downy mildew disease resistance in pearl millet. *Biologia Plantarum, 55*(3), 522-527. doi:10.1007/s10535-011-0118-3.

Ramírez-Carrasco, G., Martínez-Aguilar, K., & Alvarez-Venegas, R. (2017). Transgenerational defense priming for crop protection against plant pathogens: A hypothesis. *Frontiers in Plant Science, 8*, 696. doi:10.3389/fpls.2017.00696.

Rasmann, S., De Vos, M., Casteel, C. L., Tian, D., Halitschke, R., Sun, J. Y., ... Jander, G. (2012). Herbivory in the previous generation primes plants for enhanced insect resistance. *Plant Physiology, 158*(2), 854-863. doi:10.1104/pp.111.187831.

Raubuch, M., Behr, K., Roose, K., & Joergensen, R. G. (2010). Specific respiration rates, adenylates, and energy budgets of soil microorganisms after addition of transgenic Bt-maize straw. *Pedobiologia, 53*(3), 191-196. doi:10.1016/j.pedobi.2009.10.001.

Razdan, V. K., & Sabitha, M. (2009). Integrated disease management: Concepts and practices. En R. Peshin & A. K. Dhawan, (Eds.), *Integrated pest management: Innovation-development process: Volume 1* (pp. 369-389). Dordrecht, Holanda: Springer. doi:10.1007/978-1-4020-8992-3_15.

Regliński, T., Rodenburg, N., Taylor, J. T., Northcott, G. L., Chee, A. A., Spiers, T. M., & Hill, R. A. (2012). *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic resistance to *Diplodia pinea* in radiata pine (*Pinus radiata*) seedlings. *Forest Pathology, 42*(1), 75-78. doi:10.1111/j.1439-0329.2010.00710.x.

Resende, M. L. V., Nojosa, G. B. A., Cavalcanti, L. S., Aguilar, M. A. G., Silva, L. H. C. P., Perez, J. O., ... Castro, R. M. (2002). Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis perniciosa and Verticillium dahliae* by acibenzolar-S- methyl (ASM). *Plant Pathology, 51*(5), 621-628. doi:10.1046/j.1365-3059.2002.00754.x.

Roesch, L. F. W., Fulthorpe, R. R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A. K. M., Kent, A. D., ... Triplett, E. W. (2007). Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The Isme Journal, 1*, 283-290. doi:10.1038/ismej.2007.53.

Rosenberg, E., & Zilber-Rosenberg, I. (2016). Microbes drive evolution of animals and plants: The hologenome concept. *mBio, 7*(2), e01395-15. doi:10.1128/mBio.01395-15.

Rosenthal, G. A., & Berenbaum, M. R. (2012). *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites: ecological and evolutionary processes.* Massachusetts, EE. UU.: Academic Press. doi:10.1016/C2009-0-03210-3.

Sánchez, J., & Gallego, E. (2001). *Pythium* spp. present in irrigation water in the poniente region of almería (south-eastern Spain). *Mycopathologia, 150*(1), 29-38. doi:10.1023/A:1010815624490.

Savant, N. K., Snyder, G. H., & Datnoff, L. E. (1996). Silicon management and sustainable rice production. *Advances in agronomy, 58*, 151-199. doi:10.1016/S0065-2113(08)60255-2.

Schikora, A., Schenk, S. T., & Hartmann, A. (2016). Beneficial effects of bacteria-plant communication based on *quorum sensing* molecules of the N-acyl homoserine lactone group. *Plant Molecular Biology, 90*(6), 605-612. doi:10.1007/s11103-016-0457-8.

Schippers, B., Bakker, A. W., & Bakker, P. A. (1987). Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere

microorganisms and the effect of cropping practices. *Annual Review of Phytopathology*, *25*, 339-358. doi:10.1146/annurev.py.25.090187.002011.

Shetty, R., Jensen, B., Shetty, N. P., Hansen, M., Hansen, C. W., Starkey, K. R., & Jørgensen, H. J. L. (2012). Silicon induced resistance against powdery mildew of roses caused by *Podosphaera pannosa*. *Plant Patholgoy*, *61*(1), 120-131. doi:10.1111/j.1365-3059.2011.02493.x.

Shtienberg, D. (2007). Rational management of *Botrytis*-incited diseases: Integration of control measures and use of warning systems. En Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, & N. Delen (Eds.), *Botrytis: Biology, pathology and control* (pp. 335-347). Dordrecht, Holanda: Springer. doi:10.1007/978-1-4020-2626-3_18.

Shtienberg, D., & Elad, Y. (1997). Incorporation of weather forecasting in integrated, biological-chemical management of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, *87*(3), 332-340. doi:10.1094/PHYTO.1997.87.3.332.

Simpson, W. R., Faville, M. J., Moraga, R. A., Williams, W. M., Mcmanus, M. T., & Johnson, R. D. (2014). Epichloë fungal endophytes and the formation of synthetic symbioses in Hordeeae (=Triticeae) grasses. *Journal of Systematics and Evolution*, *52*(6), 794-806. doi:10.1111/jse.12107.

Slaughter, A., Daniel, X., Flors, V., Luna, E., Hohn, B., & Mauch-Mani, B. (2011). Descendants of primed *Arabidopsis* plants exhibit resistance to biotic stress. *Plant Physiology*, *158*(2), 835-843. doi:10.1104/pp.111.191593.

Smith, R. F., & Van den Bosch, R. (1967). Integrated control. En Kilgore, W. W. & Doutt, R. L. (Eds.), *Pest control: biological, physical, and selected chemical methods* (pp. 295–340). Nueva York, EE. UU.: Academic Press.

Snyder, W. C., Schroth, M. N., & Christou, T. (1959). Effect of plant residues on root rot of bean. *Phytopathology*, *49*, 755-756.

Spoel, S. H., & Dong, X. (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature reviews immunology*, *12*, 89-100. doi:10.1038/nri3141.

Srivastava, P., George, S., Marois, J. J., Wright, D. L., & Walker, D. R. (2011). Saccharin-induced systemic acquired resistance against rust (*Phakopsora pachyrhizi*) infection in soybean: Effects on growth and development. *Crop Protection*, *30*(6), 726-732. doi:10.1016/j.cropro.2011.02.023.

Stacey, D. (2003). Climate and biological control in organic crops. *International Journal of Pest Management*, *49*(3), 205-214. doi:10.1080/0967087031000085042.

Stenberg, J., A., Lehrman, A., & Björkman, C. (2011). Host-plant genotype mediates supply and demand of animal food in an omnivorous insect. *Ecological Entomology*, *36*(4), 442-449. doi:10.1111/j.1365-2311.2011.01285.x.

Stenberg, J. A. (2017). A conceptual framework for integrated pest management. *Trends in Plant Science*, *22*(9), 759-769. doi:10.1016/j.tplants.2017.06.010.

Stenberg, J. A., Heil, M., Åhman, I., & Björkman, C. (2015). Optimizing crops for biocontrol of pests and disease. *Trends in Plant Science*, *20*(11), 698-712. doi:10.1016/j.tplants.2015.08.007.

Stenberg, J. A., & Muola, A. (2017). How should plant resistance to herbivores be measured? *Frontiers in Plant Science*, *8*, 663. doi:10.3389/fpls.2017.00663.

Stern, V. M. R. F., Smith, R., Van den Bosch, R., & Hagen, K. (1959). The integration of chemical and biological control of the spotted alfalfa aphid: the integrated control concept. *Hilgardia*, *29*(2), 81-101. doi:10.3733/hilg.v29n02p081.

Tamiru, A., Bruce, T., Woodcock, C., Caulfield, J. C., Midega, C., Ogol, C., ... Khan, Z. R. (2011). Maize landraces recruit egg and larval parasitoids in response to egg deposition by a herbivore. *Ecology Letters*, *14*(11), 1075-1083. doi:10.1111/j.1461-0248.2011.01674.x.

Thaler, J. S., Olsen, E. L., & Kaplan, I. (2015). Jasmonate-induced plant defenses and prey availability impact the preference and performance of an omnivorous stink bug, *Podisus maculiventris*. *Arthropod-plant interactions*, *9*(2), 141-148. doi:10.1007/s11829-015-9357-0.

Theis, K. R., Dheilly, N. M., Klassen, J. L., Brucker, R. M., Baines, J. F., Bosch, T. C. G., ... Bordenstein, S. R. (2016). Getting the hologenome concept right: An eco-evolutionary framework for hosts and their microbiomes. *mSystems*, *1*(2), e00028-16. doi:10.1128/mSystems.00028-16.

Tucci, M., Ruocco, M., De Masi, L., De Palma, M., & Lorito, M. (2011). The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Molecular Plant Pathology*, *12*(4), 341-354. doi:10.1111/j.1364-3703.2010.00674.x.

United States Departmen of Agriculture (USDA). (2018). *Healthy soil for life*. Recuperado de https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/main/soils/health/.

Van De Fliert, E., Asmunati, R., & Tantowijoyo, W. (2000). *Participatory approaches and scaling-up*. Documento presentado en ciat Workshop "Working with farmers: the key to adoption of forage technologies. Citeseer. Cayagan de Oro City, Mindanao, Filipinas.

Van Der Heijden, M. G. A., Bardgett, R. D., & Van Straalen, N. M. (2007). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, *11*(3), 296-310. doi:10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x.

Van Hulten, M., Pelser, M., Van Loon, L. C., Pieterse, C. M. J., & Ton, J. (2006). Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(14), 5602-5607. doi:10.1073/pnas.0510213103.

Van Opstal, E. J., & Bordenstein, S. R. (2015). Rethinking heritability of the microbiome. *Science*, *349*(6253), 1172-1173. doi:10.1126/science.aab3958.

Vandermeer, J. H. (1992). *The ecology of intercropping*. Massachusetts, EE. UU.: Cambridge University.

Walker, J. C. (1969). Disease control through exclusion and eradication. En J. C. Walker (Ed.), *Plant Pathology* (pp. 714-740). Nueva York, EE. UU.: McGraw-Hill Book Company.

Walters, D. R., & Fountaine, J. M. (2009). Practical application of induced resistance to plant diseases: an appraisal of effectiveness under field conditions. *The Journal of Agricultural Science*, *147*(5), 523-535. doi:10.1017/S0021859609008806.

Walters, D. R., & Paterson, L. (2012). Parents lend a helping hand to their offspring in plant defence. *Biology Letters*, *8*(5), 871-873. doi:10.1098/rsbl.2012.0416.

Walters, D. R., Ratsep, J., & Havis, N. D. (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany*, *64*(5), 1263-1280. doi:10.1093/jxb/ert026.

Wall, D. H., Bardgett, R. D., & Kelly, E. (2010). Biodiversity in the dark. *Nature geoscience*, *3*, 297-298. doi:10.1038/ngeo860.

Wardle, D. A., Bardgett, R. D., Klironomos, J. N., Setälä, H., Van der Putten, W. H., & Wall, D. H. (2004). Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science*, *304*(5677), 1629-1633. doi:10.1126/science.1094875.

Warner, M. (2006). Wal-Mart eyes organic foods. *New York Times*, 12.

Willer, H., & Lernoud, J. (2017). *The World of Organic Agriculture*. Frick, Suiza: Statistics and Emerging Trends.

Woltz, S. S., & Jones, J. P. (1973). Interactions in source of nitrogen fertilizer and liming procedure in the control of *Fusarium*. *HortScience*, *8*, 137-138.

Worrall, D., Holroyd G. H., Moore J. P., Glowacz, M., Croft, P., Taylor J. E., ... Roberts M. R., (2011). Treating seeds with activators of plant defence generates long-lasting priming of resistance to pests and pathogens. *New Phytology*, *193*(3), 770-778. doi:10.1111/j.1469-8137.2011.03987.x.

Yoshioka, Y., Ichikawa, H., Naznin, H. A., Kogure, A., & Hyakumachi, M. (2012). Systemic resistance induced in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma asperellum* SKT-1, a microbial pesticide of seedborne diseases of rice. *Pest Management Science*, *68*(1), 60-66. doi:10.1002/ps.2220.

Zhu, Y., Chen, H., Fan, J., Wang, Y., Li, Y., Chen, J., ... Mundt, C. C. (2000). Genetic diversity and disease control in rice. *Nature*, *406*, 718-722. doi:10.1038/35021046.

Zilber-Rosenberg, I., & Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Review*, *32*(5), 723-735. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x.

Zotarelli, L., Dukes, M., Liu, G., Simonne, E. H., & Agehara, S. (2017). *Principles and practices of irrigation management for vegetables*. Gainesville, EE. UU.: *UF/IFAS* Extension University of Florida.

Capítulo 18

El control biológico en el contexto de un manejo integrado estratégico de insectos plaga

Chapter 18

Biological control in the context of strategic integrated insect pest management

Diego F. Rincón,[1] Eduardo M. Espitia,[1] Casey W. Hoy[2, 3]

[1] Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA)

[2] Departament of Entomology, The Ohio State University

[3] Agroecosystems Management Program, The Ohio State University, Ohio Agricultural Research and Development Center (OARDC)

Contenido

Introducción 826

Contexto histórico y el concepto de MIP 827

Definición de umbrales 828

Planes de muestreo 830

Conservación del control natural 832

El MIP y la teoría de sistemas complejos 833

El ciclo adaptativo y los sistemas agrícolas 835

Un nuevo enfoque 838

Ejemplos de implementación exitosa de programas MIP en Colombia 839

El MIP en cultivos de papa en Colombia 839

El MIP en cultivos de habichuela y fríjol en Colombia 840

El manejo de la broca del café 841

Conclusiones 843

Agradecimientos 843

Referencias 844

Resumen

El concepto tradicional de manejo integrado de insectos plaga (MIP) se conoce como una estrategia para reducir el uso de insecticidas químicos. Pese a los beneficios para el ambiente y para la salud pública que trajo la implementación de programas de MIP, el enfoque exagerado en el uso de insumos para eliminar plagas ha incrementado la vulnerabilidad de los sistemas agrícolas a los cambios del entorno. En este capítulo, se presenta un enfoque estratégico de MIP a la luz de la teoría sobre sistemas complejos. Se analiza un paralelo entre el modelo de ciclo adaptativo y las dinámicas de los sistemas agrícolas, donde se consideran los factores que pueden incrementar la resiliencia de estos sistemas a los cambios ambientales y del mercado. Se presentan ejemplos de implementación de MIP en Colombia y se destacan las características que hicieron de estos casos ejemplos de programas exitosos para un control sostenible de plagas. Dado que el objetivo es incrementar la sostenibilidad de los sistemas agrícolas, la incorporación de métodos de control biológico en programas de MIP debe enfocarse en el fortalecimiento de los sistemas agrícolas a escala local y regional. Esto puede alcanzarse mediante la conservación y el uso sostenible de la biodiversidad, y de una distribución justa del conocimiento y de las capacidades de innovación.

Palabras clave

Biodiversidad, conocimiento, innovación, resiliencia, sistema, sostenibilidad

Abstract

The traditional concept of Integrated Insect Pest Management (IPM) is known as a strategy to reduce insecticide use. Despite the clear benefits for the environment and public health that IPM implementation provided, the strong focus on the use of external inputs to kill pests has increased vulnerability of agricultural systems to environmental changes. In this chapter, we present a strategic approach to IPM in light of the theory on complex systems. We analyze a parallel between the adaptive cycle model and the dynamics of agricultural systems, considering the factors that may increase resilience of these systems to changes in environment and market. We present examples of IPM implementation programs in Colombia, highlighting the characteristics that made these cases examples of successful programs for sustainable pest control. Because the goal is to increase sustainability in agricultural systems, inclusion of biological control strategies into IPM programs should focus on strengthening agricultural systems at both regional and local scales. This could be achieved through sustainable use and conservation of biodiversity, and fair distribution of knowledge and innovation capabilities.

Keywords

Biodiversity, innovation, knowledge, resilience, sustainability, system

Introducción

Por más de setenta años, el uso de compuestos tóxicos para eliminar organismos no deseados ha sido el principal enfoque de las diferentes estrategias para el control de plagas. Los problemas ambientales y de salud pública que se han presentado (y se siguen presentando) como consecuencia de tal enfoque dieron origen, a finales de la década de los años cincuenta y principios de los sesenta, al concepto de *manejo integrado de plagas* (MIP) (Levins, 2007; Gray, Ratcliffe, & Rice, 2008). El concepto nació como la *integración complementaria de controles químicos y biológicos*, usando umbrales de acción para determinar cuándo una intervención con insecticidas químicos es necesaria para evitar que las poblaciones de las plagas alcancen un umbral de daño económico predefinido. Pese a que fue concebido para el manejo de insectos plaga, el concepto de MIP se aplica también al manejo de malezas, patógenos y vertebrados plaga (Gray et al., 2008). Actualmente, el concepto tradicional de MIP es considerado un paradigma, y es la hoja de ruta más común de los gobiernos y las entidades privadas para el manejo de plagas agrícolas (Coble & Ortman, 2008; Morse, 2008; Van Lenteren, 2009).

Pese a los notables beneficios para la salud pública y para el ambiente que trajo consigo el uso del concepto tradicional de MIP, su posterior implementación ha resultado insuficiente para reducir la dependencia de los sistemas agrícolas de los agroquímicos (Lewis, Van Lenteren, Phatak & Tumlinson, 1997). En principio, el concepto original involucra medidas preventivas y múltiples alternativas de control, pero este se ha simplificado en un enfoque *terapéutico* (táctico) basado en la aplicación de insumos (biológicos o químicos) para controlar plagas puntuales. Este enfoque ha demostrado ser una solución a corto plazo y superficial de un problema sistémico (Levins, 2007).

El enfoque terapéutico del MIP tradicional ha estimulado una gran cantidad de desarrollos para el control de plagas, pero con un impacto discutible. Los mayores y más recientes avances se han dado en los campos de la química y la biología molecular con productos o tecnologías cada vez más eficientes para eliminar organismos no deseados, y menos tóxicos para los humanos y el ambiente (Christou, Capell, Kohli, Gatehouse, & Gatehouse, 2006; Gordon & Waterhouse, 2007; Courtier-Orgogozo, Morizot, & Boëte, 2017). Sin embargo, el problema de fondo persiste.

El uso de plaguicidas en el mundo se incrementa en una media de 98.941 toneladas de ingrediente activo cada año (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2016), pero las pérdidas ocasionadas por plagas, enfermedades y malezas se mantienen entre el 30 % y el 40 % (Oerke, 2006). Además, entre 1990 y 2010 el uso de plaguicidas químicos se incrementó más rápidamente que el rendimiento por ha de los cultivos de frutas, hortalizas y cereales juntos (figura 18.1). Se calcula que por cada tonelada de rendimiento que se incrementa en estos cultivos, el uso de plaguicidas se incrementa en 110 toneladas de ingrediente activo cada año (FAO, 2016). Ante este panorama, muy inquietante en términos de sostenibilidad, el incremento en la productividad de los cultivos como resultado de la manipulación de la genética y de la fertilización química parece injustificable, especialmente si no se conciben nuevas estrategias para la protección de cultivos.

En este capítulo, se presenta un *enfoque estratégico de MIP* en el que la teoría socioecológica juega un papel central. Este enfoque incluye ideas introducidas por Lewis et al. (1997) y complementadas más tarde por Levins (2007). Nosotros profundizamos sobre el concepto a la luz de la teoría de sistemas complejos (*sensu* Holling & Gunderson, 2002), haciendo énfasis en la importancia de una *integración estratégica* de metodologías de control y en el papel del conocimiento para incrementar la sostenibilidad de los sistemas agrícolas. Al final, se presentan algunos ejemplos de la integración efectiva de agentes de control biológico a programas de MIP y se destacan las características que hicieron de estos casos ejemplos de éxito en el control sostenible de plagas.

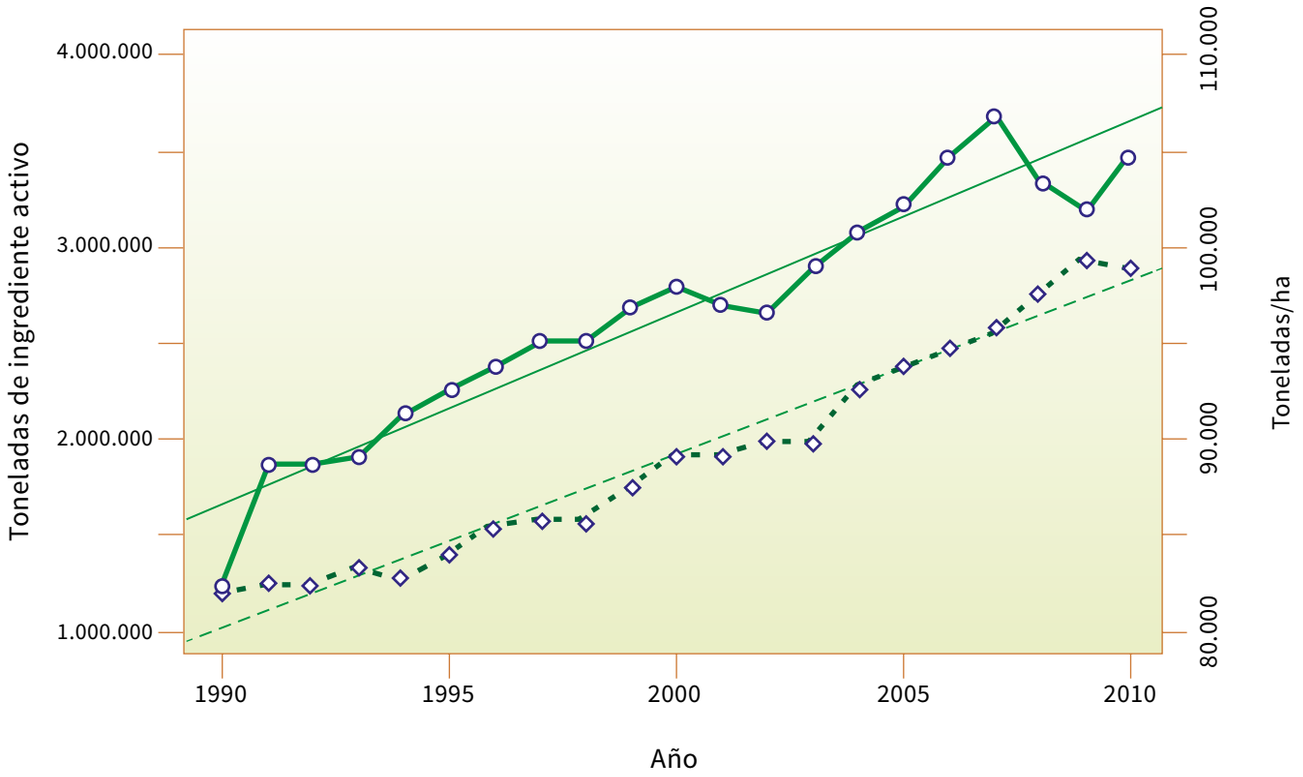


Figura 18.1. Comparación entre el crecimiento en el rendimiento global en cultivos de cereales, frutas y hortalizas (línea continua) y el uso de plaguicidas químicos (líneas discontinuas): la recta continua (pendiente = 98,941 [EE = 6,866]) y la discontinua (pendiente = 900,0 [EE = 42,74]) representan la regresión lineal del rendimiento y el uso de plaguicidas en el tiempo respectivamente.

Fuente: FAO (2016)

Contexto histórico y el concepto de MIP

La historia del MIP se deriva del uso de insecticidas en la agricultura, el cual podría ser tan antiguo como la agricultura misma. Sin embargo, los primeros registros del uso de compuestos direccionados para el control de plagas datan del 2500 a. C., varios milenios después de los primeros indicios de agricultura (Metcalf, 1994). Por siglos, los insecticidas se limitaron a sustancias extraídas de plantas y algunos compuestos inorgánicos simples que aparecieron a finales del siglo XIX. Con el descubrimiento de las propiedades insecticidas del DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis-etano) por el químico suizo Paul Herman Müller en 1939, se inició la era moderna de los insecticidas. El DDT fue utilizado con éxito durante la II Guerra Mundial para contener el peligroso avance de epidemias de enfermedades transmitidas por insectos, como: fiebre amarilla, tifo, elefantiasis y malaria (Gray et al., 2008). En la agricultura, el DDT también favoreció la producción en cultivos alimenticios y forestales y en ganadería. El éxito inicial del DDT fue tal, que los insecticidas fueron prácticamente el único método de control de insectos entre 1950 y principios de la década de los ochenta. Como consecuencia, las evidencias de desbalances ecológicos severos se empezaron a acumular: resistencia a insecticidas, acumulación de clorinatos aromáticos en la cadena alimenticia, reducción de poblaciones de enemigos naturales, brotes de plagas secundarias, resurgencia de plagas primarias y aparición de residuos de insecticidas en frutas y vegetales (Metcalf, 1994).

A raíz de los evidentes desequilibrios ecológicos y los problemas de salud pública ocasionados por la dependencia de los insecticidas, cuatro científicos de California (EE. UU.) articularon el concepto de MIP (Stern, Smith, Van den Bosch, & Hagen, 1959). Como es sintetizado por Naranjo y Ellsworth (2009), el concepto original de MIP elaborado por Stern et al. (1959) está compuesto de cuatro elementos: 1) umbrales para determinar la necesidad de controlar las poblaciones plaga, 2) planes de muestreo para detectar los niveles críticos de las plagas, 3) comprensión y conservación del control natural ejercido por enemigos naturales presentes en el sistema, y 4) uso de insecticidas selectivos u otros métodos de control que complementen, mas no reduzcan, el control natural.

Definición de umbrales

Junto con la introducción del MIP, Stern et al. (1959) acuñaron y definieron varios conceptos relacionados con los umbrales para determinar la necesidad de la aplicación de un control. La presencia de cierta plaga en un cultivo puede resultar en un *daño* fisiológico a las plantas, que se traduce en, por ejemplo, pérdida de área foliar o pérdida de capacidad fotosintética. Ese *daño*, a su vez, puede resultar en un *perjuicio* para el cultivo, el cual se expresa en términos de la reducción en cantidad o calidad del rendimiento. El *daño* es expresado en términos fisiológicos, mientras que el *perjuicio* en unidades que expresen la cantidad o la calidad de la cosecha (p. ej., bultos de papa, tallos de rosas con calidad de exportación, etc.). Si se conoce el precio de esta por kg, es posible determinar la densidad de plaga (insectos/planta, plantas con síntomas de enfermedad, etc.) que puede ocasionar un *perjuicio* cuyo costo equivalga al costo del control. Esa densidad de plaga se conoce como el *umbral de daño económico* (UDE). Sin embargo, muchos métodos de control no tienen un efecto inmediato sobre el *daño* que ocurre progresivamente, por lo que generalmente las medidas de control deben aplicarse en un nivel de plaga inferior al UDE. Ese nivel de plaga se conoce como *umbral económico* (UE) (figura 18.2).

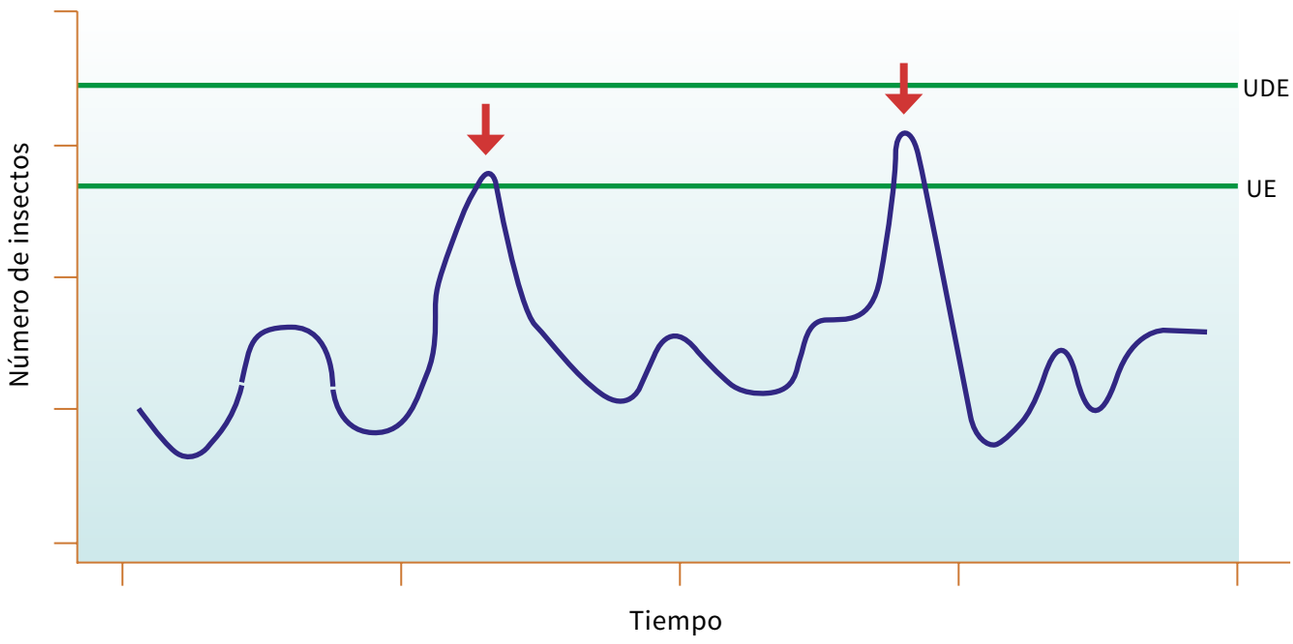


Figura 18.2. Dinámica de una plaga en la que se muestra la relación entre el umbral de daño económico (UDE) y el umbral económico (UE); las flechas indican la aplicación de una estrategia de control.

Fuente: Modificado de Pedigo y Rice (2014)

En el sentido más estricto, el cálculo del UE debe incorporar información sobre la tasa de crecimiento de la plaga. Debido a que la tasa de crecimiento de las plagas rara vez es predecible en las variables condiciones de campo, el UE convencionalmente se determina como un porcentaje (fijo o variable) del UDE (Pedigo & Rice, 2014). Actualmente, los conceptos de UDE y UE son usados ampliamente por técnicos, profesionales e investigadores del área del manejo de plagas (insectos, enfermedades y arvenses).

Para calcular el UDE, es necesario cuantificar la relación entre el daño ejercido por la plaga y el rendimiento del cultivo. Esta relación se basa en la respuesta de la planta al daño, la cual depende de cinco factores (Pedigo, Hutchins & Higley, 1986): 1) tiempo en el que ocurre el daño con respecto a fenología del cultivo, 2) parte de la planta sujeta al daño, 3) tipo de daño (defoliación, succión, etc.), 4) severidad del daño, y 5) factores ambientales. La consideración de algunos o de todos estos factores depende del cultivo y de la plaga que está bajo estudio, aunque la severidad (cantidad) del daño es el factor más importante para la definición de umbrales en la mayoría de las interacciones daño-rendimiento. Una excepción notable son cultivos en los que la tolerancia al daño o el UDE resultan ser tan bajos que factores diferentes a la severidad del daño (p. ej., la parte de la planta sujeta al daño, el clima, etc.) pueden ser más prácticos para la definición de los umbrales (Hoy, McCulloch, Sawyer, Shelton, & Shoemaker, 1990).

Dos tipos de ensayos se usan para determinar la relación entre la severidad del daño y el rendimiento. El primero es un experimento controlado en el que se establecen unidades experimentales (parcelas) de cultivo sometidas a diferentes densidades de plaga, incluyendo parcelas sin plaga que sirven como control. Otra opción es un estudio observacional en el que se toman muestras de diferentes cultivos en zonas de producción que contengan información sobre la densidad de la plaga y el rendimiento. En ambos casos, el resultado es una curva de respuesta del rendimiento en función de la densidad de la plaga. Pedigo et al. (1986) presentan una curva de daño generalizada que describe la relación teórica entre *la intensidad de daño y el rendimiento* (figura 18.3).

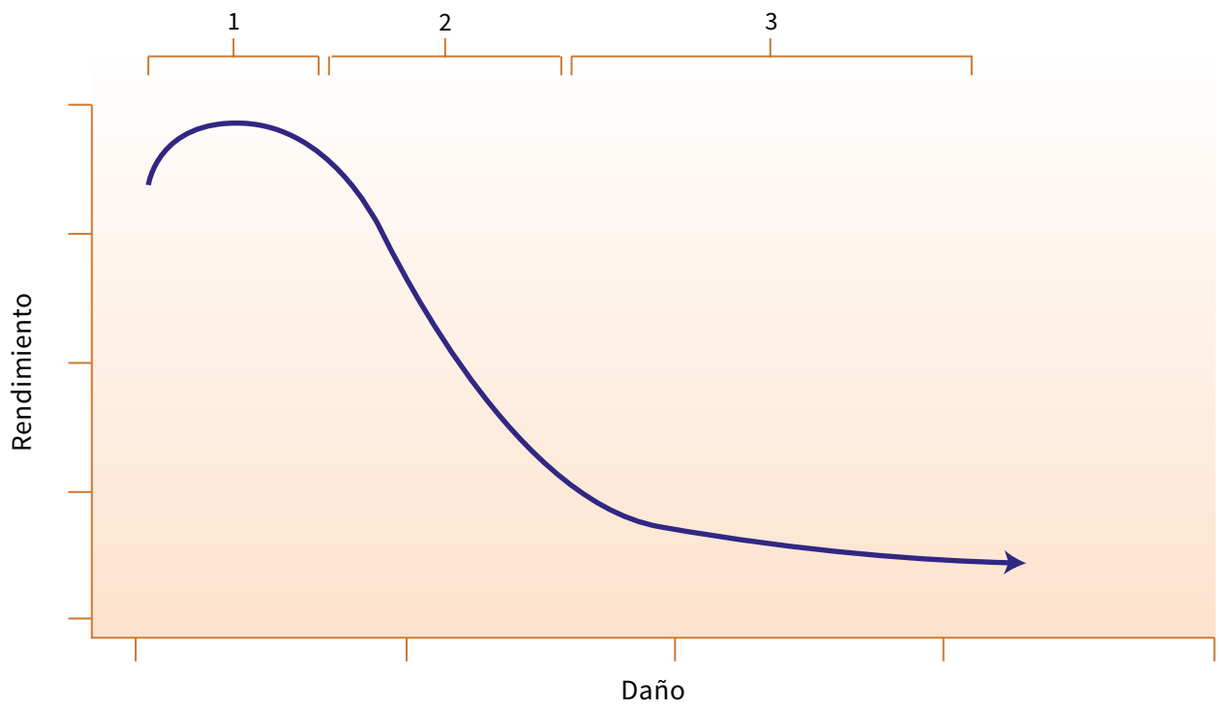


Figura 18.3. Relación teórica entre daño y rendimiento de un cultivo: la etapa 1 se refiere a la tolerancia/sobrecompensación; la etapa 2, a la reducción lineal del rendimiento, y la etapa 3, a la insensibilización de la respuesta del cultivo al daño.

Fuente: Modificado de Pedigo et al. (1986)

Inicialmente, el cultivo tiene una tolerancia al daño e incluso puede compensar o sobrecompensar el daño ejercido por una plaga. Posteriormente, se observa una relación lineal negativa entre el daño y el rendimiento, que es luego interrumpida por un periodo de disminución del incremento del daño por unidad de incremento de plaga (insensibilización) ocasionado por competencia entre individuos de la plaga.

En la práctica, la curva de respuesta del rendimiento rara vez luce como la figura 18.3. Por cuestiones logísticas, el rango de densidades de plaga que es posible evaluar en relación con el rendimiento es limitado. Por ejemplo, rara vez es posible detectar el periodo de tolerancia o sobrecompensación, por lo que muchas veces la curva es monotónica decreciente (p. ej., exponencial negativa o lineal negativa). Los modelos empíricos más usados para describir la relación e intensidad de daño-rendimiento son: monomolecular negativo, exponencial negativo y logístico negativo. En cualquier caso, los datos generalmente se ajustan a varios modelos y luego se lleva a cabo la selección del modelo más adecuando utilizando métodos formales, como el criterio de información de Akaike (AIC, por su sigla en inglés), el criterio de información bayesiano (BIC, por su sigla en inglés) o el coeficiente de determinación. Existen excelentes libros de texto que presentan los modelos empíricos, explican el paso a paso de la estimación de parámetros y el procedimiento para seleccionar el mejor modelo (p. ej., Madden, Hughes, & Bosch, 2007; Bolker, 2008).

Para estimar el UDE, primero debe calcularse el rendimiento potencial (RP) y el rendimiento real (RR). Estos parámetros se calculan con el modelo daño-rendimiento: RP corresponde al valor predicho cuando la densidad de la plaga es 0, y RR corresponde a RP menos el costo del control expresado en términos de kg cosechado (Cc). El UDE es la densidad de la plaga cuando el rendimiento corresponde al RR. El valor de RR se inserta en el modelo daño-rendimiento, y este se resuelve para la densidad de la plaga (es decir, variable independiente de modelo daño-rendimiento). Es importante tener en cuenta que el UDE no es un valor fijo, sino que puede variar en función del precio del producido, del Cc o de ambos.

Planes de muestreo

El diseño de un plan de muestreo eficiente y práctico para determinar el estado de las poblaciones de la plaga objetivo con relación al UDE puede ser una limitante para la aplicación del MIP. De hecho, Stern et al. (1959) reconocen que el muestreo y el diagnóstico de los niveles de una población de insectos plaga deben ser llevados a cabo por entomólogos profesionales, debido a que la mayoría de los métodos de muestreo toman más tiempo y esfuerzo del que muchos agricultores aceptarían. Afortunadamente, algunos avances posteriores en estadística han facilitado el desarrollo de planes de muestreo de máxima eficiencia que podrían ser usados por agricultores.

La idea es clasificar (no necesariamente estimar) el tamaño de las poblaciones de la plaga en una de al menos dos categorías: por encima del UE (umbral económico) o por debajo del UE. La forma más eficiente de llevar a cabo con tal clasificación es a través de un muestreo secuencial. En este tipo de muestreo, al tiempo en el que los conteos de la plaga son recolectados (x_i), el acumulado (Σx_i) se va actualizando y comparando con el tamaño de la muestra hasta ese momento. El muestreo termina cuando la curva del acumulado de conteos en función del tamaño de la muestra cruza una de las dos (o más) líneas críticas predefinidas. Dependiendo de la línea que se cruzó (umbral inferior o superior), se decide si debe aplicarse o no un método de control (figura 18.4a) y, en algunos casos (es decir, más de dos líneas críticas), la frecuencia de los muestreos subsiguientes (figura 18.4b).

Para desarrollar un plan de muestreo secuencial, el procedimiento más popular se conoce como la razón de probabilidades secuencial de Wald (SPRT, por su sigla en inglés) (Wald, 1945). El SPRT fue desarrollado por Abraham Wald, un húngaro judío que emigró a los EE. UU. durante la II Guerra Mundial, para determinar con precisión el estado del armamento antiaéreo aliado usando el menor número de muestras posible. La idea general del SPRT, aplicado a un plan de muestreo de MIP, es llevar a cabo una prueba de hipótesis para clasificar la densidad de la plaga, m, una vez se cuente con evidencia suficiente para alcanzar un nivel de precisión predefinido. La hipótesis nula, Ho, en la que $m = m_0$, es confrontada con la hipótesis alterna, Ha,

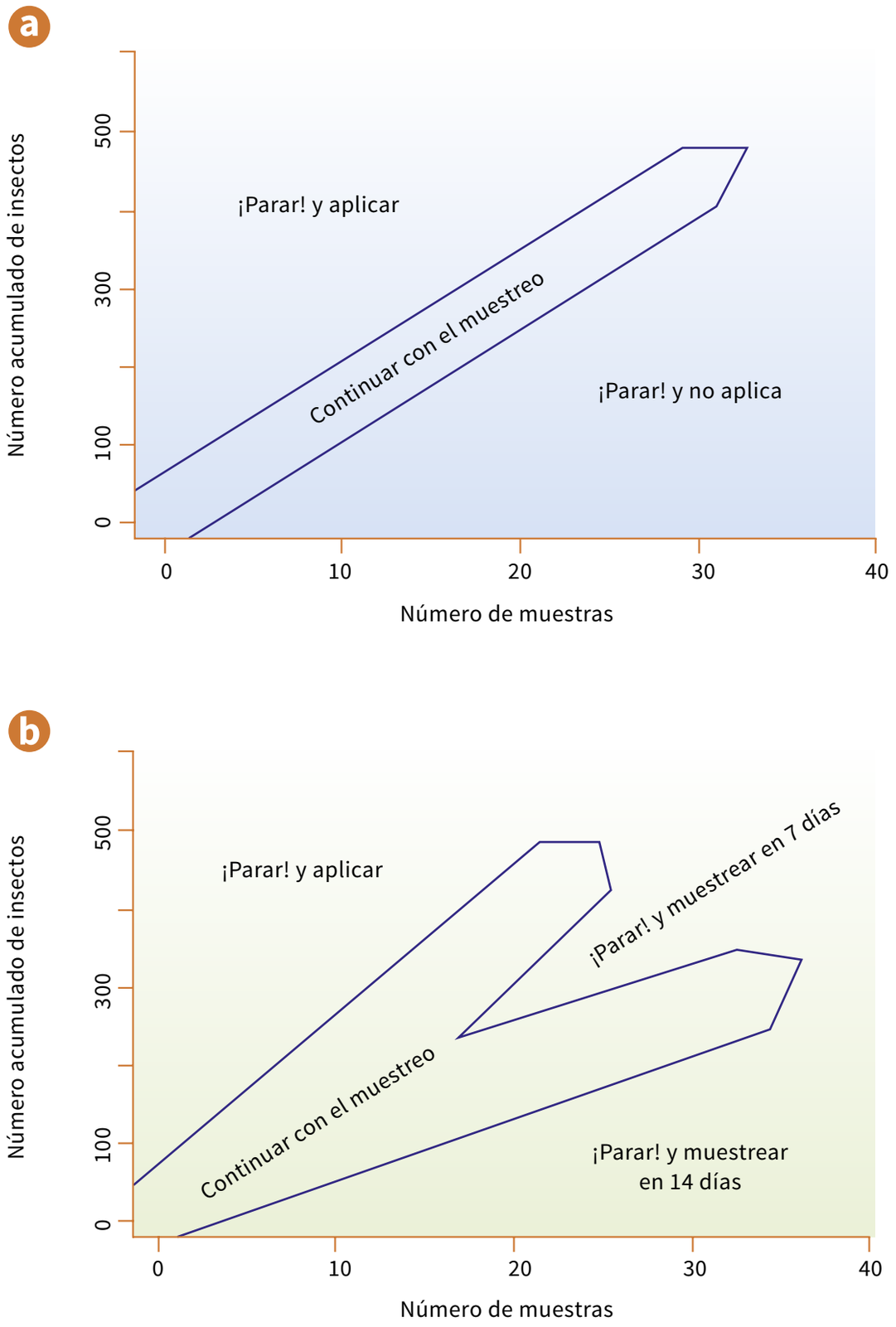


Figura 18.4. Ejemplos hipotéticos de planes de muestreo secuencial: el usuario toma muestras del cultivo y va marcando el número acumulado de insectos con el número de muestras recolectadas. El muestreo se termina cuando la línea de acumulado cruza alguna de las líneas de la gráfica, cuando se toma la decisión respectiva. El plan de muestreo puede basarse en dos (a) o más líneas críticas (b).

Fuente: Modificado de Binns et al. (2000)

que significa que $m = m_1$, donde $m_0 < \text{UE} \leq m_1$. Para calcular las líneas críticas de un plan de muestreo SPRT, además de conocer el UE, se debe contar con suficiente información para estimar los parámetros de un modelo de distribución de probabilidades que describa los conteos de la población de la plaga por unidad de muestreo (p. ej., distribución binomial negativa, distribución binomial, etc.).

Un segundo método para desarrollar un plan de muestreo secuencial fue desarrollado por Iwao (1975) y se conoce como el método de muestreo secuencial de Iwao (ISP, por su sigla en inglés). Este método se basa en el intervalo de confianza del UE y tiene la ventaja de que no es necesario ajustar los conteos de la plaga por unidad de muestreo a alguna distribución de probabilidades. En cambio, el requisito para implementar el ISP es que la varianza de las muestras pueda ser modelada en función del promedio. Para esto, existen dos modelos empíricos que pueden ser ajustados a datos de varianzas y promedios recolectados en campo. Uno de estos se conoce como la relación varianza-media de Iwao (IVM, por su sigla en inglés) y el otro como la ley de potencia de Taylor (TPL, por su sigla en inglés). Ambos modelos se han usado ampliamente para describir varianzas en función de promedios, aunque la TPL parece funcionar para un rango más amplio de especies y el significado ecológico de sus parámetros ha sido más estudiado que el de aquellos del IVM (Taylor, Woiwod, & Perry, 1978; Taylor, Lindquist, & Shipp, 1998; Kendal, 2004). Además, la mayoría de las funciones establecidas para determinar líneas críticas, parámetros de distribuciones de probabilidades y procedimientos de validación de planes de muestreo (función de características operativas y curva del promedio del número de muestras) se encuentran desarrolladas en términos de los parámetros de la TPL (Binns, Nyrop, & Werf, 2000).

Un tercer método de muestreo expone una debilidad clave de los programas de MIP basados en el uso de insecticidas de acuerdo con umbrales y para plagas puntuales. El muestreo de intensidad variable (Hoy, Jennison, Shelton, & Andaloro, 1983; Binns & Nyrop, 1992) requiere de una estimación secuencial, pero la precisión y el esfuerzo de muestreo se van reajustando de acuerdo al UE. El método requiere de un muestreo más intensivo cuando el tamaño de la población de la plaga está cerca al UE, porque este momento es cuando se necesita una mayor precisión para tomar una decisión de intervención. Cuando la población está muy por encima o muy por debajo del umbral, se necesita menos precisión y el esfuerzo de muestreo es menos intensivo y requiere de menos tiempo (figura 18.5). Otro aspecto práctico de este método es que el muestreo se lleva a cabo a lo largo de todo el universo de muestras (es decir, a lo largo de uno o más transectos que traviesan el cultivo). Así, aunque la intensidad del muestreo se basa en la observación de una plaga puntual, el agricultor tiene la oportunidad de recorrer el cultivo e inspeccionar la presencia de otras plagas. Aunque las plagas más dañinas requieren de una mayor atención, todas las plagas que ocurren deberían ser muestreadas y vigiladas.

Desafortunadamente, los programas de MIP convencionales tienden a enfocarse en plagas y umbrales puntuales, ignorando la complejidad inherente del manejo integrado de los ensamblajes de plagas que atacan a los cultivos de manera simultánea. El enfrentar esta realidad más compleja requiere de un cambio en la concepción de los cultivos, del control químico para una especie plaga puntual que alcanza un UE puntual hacia un enfoque de ecología de poblaciones, comunidades y paisajes que incluya todas las plagas y organismos benéficos asociados al sistema. Este cambio de concepción del cultivo y su manejo se explora en las secciones "El MIP y la teoría de sistemas complejos" y "Ejemplos de implementación exitosa de programas MIP en Colombia" del presente capítulo.

Conservación del control natural

Aunque la implementación del MIP puede favorecer el control natural, la mayoría de intervenciones de control de las plagas no buscan deliberadamente su restablecimiento. En la práctica, pocas veces los programas de MIP establecen medidas activas para favorecer el control natural. Las técnicas aplicadas, en cambio, priorizan la rapidez en la supresión de poblaciones de una plaga (o grupo de plagas) a la vez, a una escala de tiempo y espacio limitada al lote de cultivo. El impacto de estas técnicas dificulta ulteriormente el aprovechamiento del control natural y puede incluso facilitar la emergencia de brotes de plagas secundarias (p. ej., Hill, Macfadyen, & Nash, 2017).

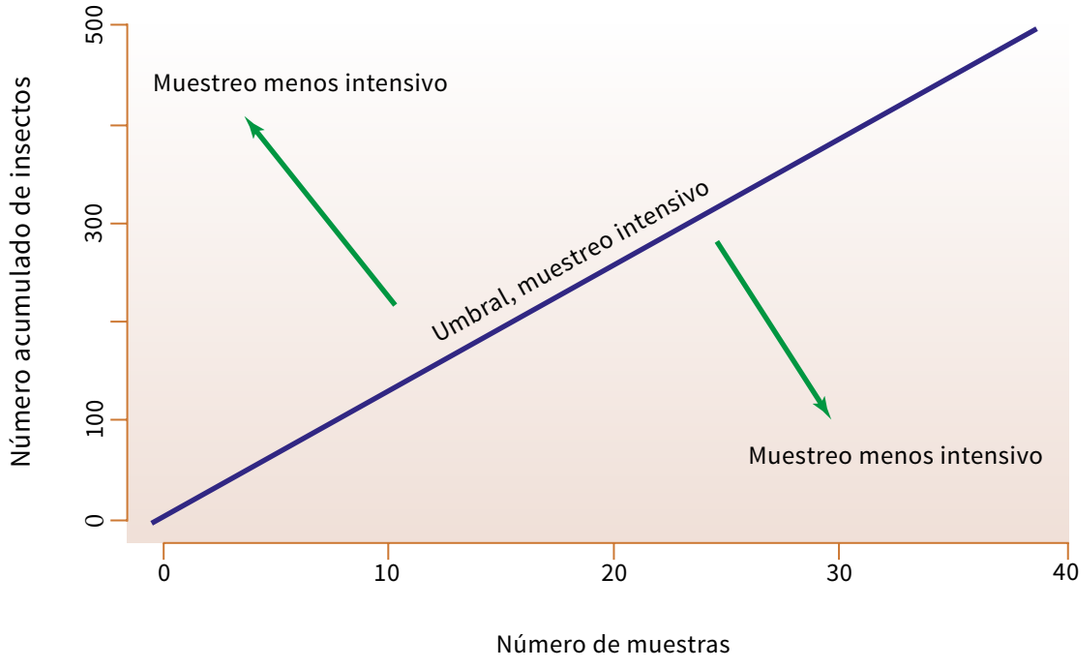


Figura 18.5. Ejemplo hipotético de un plan de muestreo de intensidad variable: el muestreo se realiza en etapas; por ejemplo, cuatro plantas seleccionadas al azar, en cada una de las etapas, que se ubican equidistantes a lo largo de un transecto que atraviesa el cultivo. Después de llevar a cabo el muestreo en cada etapa, se toma una decisión acerca de qué tan intenso debe ser el muestreo en la siguiente etapa. Al menos una planta debe ser muestreada en cada etapa a lo largo del transecto completo. El muestreo es menos intensivo si el número de insectos está muy por encima o muy por debajo del umbral económico.

Fuente: Elaboración propia

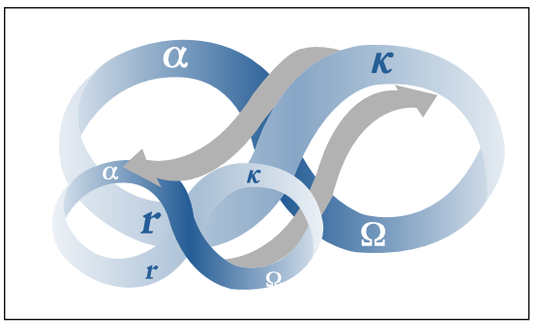
Por otro lado, los métodos de control implementados en programas de MIP se han limitado a la aplicación de técnicas o al uso de insumos de menor impacto directo sobre el ecosistema. Si bien estas técnicas son preferibles a las de mayor impacto, podrían ser insuficientes para favorecer la sostenibilidad de los sistemas agrícolas. El uso indiscriminado de plaguicidas en la agricultura comercial ha continuado (Epstein & Bassein, 2003), a pesar de años de trabajo en la integración de controles alternativos. La relevancia que debe tener el control natural en la propuesta de un MIP más estratégico se explora en las secciones "El MIP y la teoría de sistemas complejos" y "Ejemplos de implementación exitosa de programas MIP en Colombia" del presente capítulo.

El MIP y la teoría de sistemas complejos

Los cultivos agrícolas son esencialmente sistemas adaptables, complejos e integrados, en donde la naturaleza se mezcla inevitablemente con intereses socioeconómicos. El proceso consiste en sembrar semillas y realizar las labores necesarias para producir bienes a partir de las mismas. Los ciclos se repiten una y otra vez: se configura un ambiente adecuado, buscando que una o varias especies vegetales exploten de la manera más eficiente un recurso con el propósito de acumular una producción. La producción es extraída del sistema (idealmente por el agricultor, aunque puede ser reducida por los insectos plagas o por las enfermedades) y el remanente del cultivo es removido para permitir la reorganización de un nuevo ciclo.

Los ciclos del sistema también pueden visualizarse a escalas espaciales y temporales más amplias (figura 18.6). En ciertas regiones de vocación agrícola, las

comunidades de agricultores acumulan capacidades, conocimiento e infraestructura para la producción de determinados bienes. Con el tiempo, la funcionalidad y la productividad del sistema se hacen progresivamente más eficientes y, al mismo tiempo, dependientes de unas pocas tecnologías o prácticas adoptadas por la mayor parte de la comunidad de agricultores. Eventualmente, el efecto de ciertos factores externos al sistema, tales como la incertidumbre en los precios del mercado, el clima o los brotes de plagas o patógenos, pueden causar el colapso o la destrucción del sistema tal como se encontraba configurado. El sistema luego se reorganiza para restablecer su funcionalidad y productividad, usando el capital acumulado de materia, capacidades, conocimiento e infraestructura para así volver a iniciar un nuevo ciclo de acumulación de materia y capital.



α

- Nuevos nichos de mercado abiertos.
- Oportunidades abiertas para innovación y desarrollo.

κ

- Baja diversidad de productos.
- Sistema dependiente de pocos métodos de control de plagas y productos.

Conservación

Reorganización

Explotación

Liberación

- Métodos de control de plagas altamente eficientes.
- Nuevo nicho de mercado identificado.

r

- Resistencia a insecticidas.
- Precios bajos en el mercado.
- Aparición de nuevas plagas.

Ω

Figura 18.6. Ciclo adaptativo de sistemas complejos aplicado al control de plagas en sistemas agrícolas a escala regional: en la esquina superior derecha se muestra la interacción del ciclo con otros que operan a diferentes escalas.

Fuente: Modificado de Holling y Gunderson (2002)

El ciclo adaptativo y los sistemas agrícolas

Los ciclos de los sistemas agrícolas se ajustan al modelo de ciclo adaptativo propuesto por Holling (1985), el cual es usado como herramienta para comprender las dinámicas de sistemas complejos a diferentes escalas. El modelo de ciclo adaptativo ha sido usado para explicar *procesos ecológicos* como la sucesión en bosques (Holling & Gunderson, 2002) y la estacionalidad de comunidades (Sommer et al., 2012); *procesos sociales* como el apogeo y el declive de civilizaciones antiguas (Diamond, 2005) y los cambios en las sociedades occidentales contemporáneas (Gilpin, 2000), así como *procesos socioecológicos*, como la dinámica de la aparición de poblaciones resistentes a insecticidas químicos (Hoy, 2008) y varios sistemas agroecológicos (Walker, Holling, Carpenter, & Kinzig, 2004). La figura 18.6 muestra una representación gráfica del ciclo adaptativo y de la interacción entre sistemas que operan a diferentes escalas. En breve, la trayectoria del ciclo generalizado alterna entre largos periodos, lentos y sostenidos, de acumulación y transformación de recursos (de fase r a fase K) y periodos más cortos de innovación y reorganización (de fase Ω a fase α). Durante la lenta transición entre r y K, la conectividad y la estabilidad del sistema se incrementan y se acumula capital en forma de materia o conocimiento (fase de explotación). En los ecosistemas, por ejemplo, se acumulan biomasa y nutrientes, y las interacciones entre especies y recursos se vuelven progresivamente más fuertes y rígidas, evitando así que nuevos competidores puedan ingresar al sistema (Holling, 1973). En sistemas socioeconómicos, se acumula infraestructura, habilidades y conocimiento, mientras que la confianza mutua crece en las relaciones humanas, haciendo las redes de interacciones cada vez más predecibles y dependientes (Holling & Gunderson, 2002).

La acumulación de materia y el incremento en la rigidez de las interacciones hacen que el sistema pierda capacidad para conservar la funcionalidad y la estructura frente a disturbios ocasionados por el clima, los precios del mercado o los brotes de plagas o patógenos (fase de conservación). La pregunta ya no es si el sistema colapsará, sino si será capaz de recobrar su función y estructura después del colapso. La siguiente fase se conoce como *liberación* y se caracteriza por la abrupta pérdida de funcionalidad del sistema tal como estaba configurado. De acuerdo con la teoría de sistemas complejos, esta capacidad de reorganización después del colapso dependerá del capital acumulado (es decir, materia, capacidades, conocimiento e infraestructura) durante ciclos anteriores (fase de reorganización) (Holling & Gunderson, 2002; Folke, Hahn, Olsson, & Norberg, 2005).

Los sistemas adaptables no están aislados. Estos generalmente hacen parte de una panarquía de sistemas que operan a diferentes escalas espaciotemporales (Holling & Gunderson, 2002). Los factores que incrementan el riesgo de colapso (transición de fase K a fase Ω) generalmente vienen de las escalas más pequeñas. Por ejemplo, la emergencia de nuevas plagas ocurre en cultivos a escala local, pero eventualmente tiene un impacto regional. Por el contrario, los ciclos que operan a escalas más grandes tienen la capacidad de proveer capital para contribuir con la reorganización de ciclos que operan a escalas más pequeñas, ya que estos pueden acumular una mayor cantidad de capital y sus colapsos ocurren en intervalos de tiempo más largos. Por ejemplo, ante la emergencia de una nueva plaga, es de esperarse que parte de las soluciones a escala local provengan de instituciones de investigación y desarrollo o de políticas agrícolas que hacen parte de ciclos adaptativos de escalas superiores (figura 18.6).

La capacidad del sistema para persistir, conservado sus interacciones más importantes y absorbiendo cambios importantes causados por disturbios, es lo que Holling (1973) define como *resiliencia*. Esta capacidad poco tiene que ver con la estabilidad o la capacidad del sistema para permanecer en equilibrio con una producción sostenida de recursos aprovechables. De hecho, la manipulación de un sistema para maximizar (y estabilizar) su productividad puede reducir su resiliencia, es decir que un evento catastrófico que antes pudo haber sido absorbido, ahora puede desencadenar la pérdida total de la integridad estructural del sistema (Walker et al., 2004). La pérdida de resiliencia generalmente se deriva de una simplificación y especialización del sistema para lograr una economía de escala. El enfoque convencional del manejo de sistemas agrícolas tiene como objetivo la conservación de la estabilidad muy cerca de un punto de máxima productividad. Esto se logra normalmente mediante la especialización de los sistemas en la producción de uno o pocos productos y

la búsqueda de una economía de escala. Sin embargo, para lograr una economía de escala generalmente es necesaria una producción uniforme, y a gran escala, de un solo producto a expensas de la diversidad biológica necesaria para la integración efectiva de diversos controles biológicos y físicos naturales e introducidos artificialmente. En una economía de escala, la diversidad de controles del sistema es remplazada por el uso de insecticidas y otros insumos químicos o biológicos. Estos insumos son fáciles de justificar económicamente, reducen la necesidad de mano de obra y simplifican, de alguna manera, el manejo del cultivo. No obstante, el uso constante de insumos también conduce a que el funcionamiento y la productividad de los sistemas agrícolas dependa de la adquisición y la aplicación de insumos externos.

El enfoque de escala es muy útil si se trata de conservar la utilidad de un sistema ideado por un ingeniero para desarrollar una tarea específica dentro de un rango de condiciones bien delimitado. En este caso, el enfoque de contrarrestar cualquier fluctuación por fuera de un punto de equilibrio puede ser el más eficiente. Sin embargo, los sistemas adaptables (p. ej., sistemas agrícolas) se encuentran profundamente afectados por cambios en variables externas que no son fácilmente controlables ni predecibles (Lewis et al., 1997; Holling & Gunderson, 2002). En este caso, la *conservación* de un determinado estado del sistema (estabilidad) pierde relevancia, mientras que la promoción de elementos que favorezcan la *capacidad adaptativa* del sistema y su *persistencia* en el tiempo (resiliencia) se convierten el objetivo primordial.

Con el propósito de llevar a la práctica la construcción de resiliencia en sistemas socioecológicos, se han identificado cuatro factores que la pueden favorecer (Berkes, 2007). A continuación, se describen estos factores a la luz de un MIP convencional en agricultura:

1. *Aprender a vivir con el cambio y la incertidumbre:* este factor implica dos requisitos: a) la construcción de una memoria colectiva y de una capacidad de aprender de eventos catastróficos pasados, y b) una actitud proactiva ante la incertidumbre mediante el fomento del desarrollo de soluciones ante nuevos problemas que puedan presentarse en el futuro. En el contexto del manejo de plagas agrícolas, un evento catastrófico podría ser la aparición de una nueva plaga o la evolución de resistencia a insecticidas de una ya existente. Ante la aparición un evento de este tipo, el MIP convencional cuenta con un sistema apropiado para el cumplimiento del primer requisito. Los programas de desarrollo de nuevas moléculas o formulaciones de plaguicidas o bioplaguicidas de ciertas instituciones privadas y públicas cuentan con una aceptable capacidad de reacción ante la aparición de resistencia o la emergencia de nuevas plagas. Estos desarrollos, generalmente, se basan en experiencias de eventos pasados similares. Sin embargo, el sistema es inapropiado en cuanto a la actitud proactiva hacia la incertidumbre (requisito 2), ya que convive con el fuerte supuesto de que siempre habrá un nuevo insecticida efectivo cada vez que sea necesario. Más aún, se convive con el supuesto de que los costos de los insumos, de los que la producción a escala depende, no cambiarán significativamente en el tiempo. En este escenario, las capacidades de reacción se concentran en los ciclos que operan a escala institucional (Hoy, 2008), dejando los ciclos que operan a escalas más locales sin herramientas de conocimiento, experiencia o infraestructura para reaccionar ante un evento catastrófico.
2. *Promover la diversidad para la renovación y la reorganización:* la diversificación es una estrategia universal para reducir el riesgo de colapso e incrementar las opciones en épocas de crisis (Turner et al., 2003). Por ejemplo, empresas e instituciones públicas y privadas de todas las escalas y naturalezas incrementan la diversidad de sus negocios y objetivos como medio para reducir su vulnerabilidad, incluso a costa de la reducción en la calidad del producto (Rumelt, 1982; Michel & Shaked, 1984). El concepto de diversidad biológica (es decir, biodiversidad) es bastante amplio, ya que se refiere a la variedad de los organismos consideranda en todos los niveles, es decir, desde la variedad genética de las poblaciones, pasando por la variedad de las diferentes categorías taxonómicas hasta la variedad de los ecosistemas (Begon, Townsend, & Harper, 2006; Chao & Just, 2012). Una localidad con alta biodiversidad no solo cuenta con un gran número de especies, sino que las poblaciones que allí habitan deben mantener el suficiente acervo genético para perdurar en un ambiente de cambios constantes. La heterogeneidad

espacial es el gran generador de la diversidad de adaptaciones que reducirá el riesgo de colapso e incrementará las opciones en épocas de crisis (p. ej., invasiones biológicas, brotes de plagas o catástrofes ambientales). Sin embargo, la implementación de sistemas agrícolas, con frecuencia, implica la homogeneización del ambiente. En particular, las economías agrícolas de escala requieren que los agricultores se especialicen en uno o en pocos productos, lo que generalmente implica una producción uniforme a escalas espaciales masivas para justificar la enorme inversión de capital en equipos y tecnología. Las economías de escala promueven la producción de bienes (por definición, productos estandarizados para los cuales el origen es irrelevante) al menor costo posible a escala global, pero la producción misma alcanza escalas que no son propicias para estrategias de control que integren múltiples tácticas, especialmente de control biológico o cultural. Los programas de MIP convencionales implican (en teoría) la conservación de una diversa gama de métodos de control que deben ser usados sinérgicamente (integrados), pero no implican necesariamente la promoción de la biodiversidad como una estrategia integrada. Además, con el tiempo, las estrategias preventivas (culturales) de control de plagas usualmente van perdiendo relevancia, y el MIP convencional tiende a simplificarse en un sistema para decidir cuándo aplicar insecticidas (Lewis et al., 1997). Pese a que la diversidad (biodiversidad y diversidad de métodos de control de plagas) es un capital que puede generar resiliencia en ciclos productivos en las escalas más pequeñas, la excesiva simplificación del sistema y la creciente dependencia en la aplicación de insecticidas deja a los ciclos que operan a estas escalas sin capacidades para reducir riesgos ni opciones para afrontar crisis.

3. *Combinar diferentes clases de conocimiento para favorecer el aprendizaje:* este factor implica la combinación del conocimiento tradicional con la ciencia. En teoría, el MIP tradicional promueve la *integración* del conocimiento acumulado por generaciones de agricultores con métodos de control más modernos. Sin embargo, esto no se traslada a la práctica. Con frecuencia, el desarrollo de sofisticadas moléculas de insecticidas conlleva al desplazamiento del control biológico y de otras tecnologías tradicionales para el manejo de plagas (Thomas, 1999). Son varios los casos en los que la aparente eficiencia de una nueva molécula ha desplazado la combinación de estrategias en programas de MIP que tardaron décadas en implementarse. Por ejemplo, luego de 15 años de trabajo articulado y continuado en Europa para la implementación de programas de MIP, estos terminaron por ser desplazados por los piretroides, un grupo de insecticidas que fue introducido en el mercado durante los años ochenta (Van Lenteren, 2009). Algo similar ocurrió con el desplazamiento del uso de *Encarsia formosa* Gahan (Hymenoptera: Aphelinidae) para el control de la mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae) con la aparición de una nueva generación de insecticidas después de la II Guerra Mundial (Van Lenteren & Woets, 1988). En la práctica, la mayor parte de los programas de MIP terminan por desplazar el conocimiento tradicional y se convierten esencialmente en sistemas de monitoreo para reducir el uso de plaguicidas químicos. De esta manera, el capital de conocimiento se concentra en las escalas institucionales, mientras que aquel desarrollado y acumulado en escalas más pequeñas se pierde debido a su incompatibilidad con los desarrollos institucionales.

4. *Crear oportunidad para la autoorganización:* este factor implica dos requisitos (Folke et al., 2005): a) fortalecimiento del manejo comunal de los sistemas, y b) construcción de capacidades de manejo y gestión entre diferentes escalas. El primer requisito se refiere a la capacidad del sistema de mantener lazos sociales y políticos para encarar eventos catastróficos. En un contexto de manejo de plagas, este requisito se refiere a la necesidad de la implementación de MIP regionales, y no en cultivos o fincas aisladas. Esto implica una conciencia entre los agricultores de que las plagas son un fenómeno regional, que debe ser abordado como tal. Pese a que los beneficios de implementar sistemas de toma de decisión regional en comparación con aquellos más locales (dentro de lotes de cultivo) han sido ampliamente documentados, los programas de MIP regionales exitosos son relativamente escasos

(Brewer & Goodell, 2012). El segundo requisito implica una capacidad de transferir soluciones entre ciclos adaptativos que operan a diferentes escalas. En ocasiones, los problemas no pueden ser solucionados apropiadamente únicamente a través de la asociación entre varios sistemas locales. En estos casos, es necesario el concurso de instituciones que hagan parte de ciclos a escalas superiores que provean salidas que no son fácilmente vislumbradas por los actores de escalas locales. Un buen ejemplo de esta situación es la problemática generada por la epidemia del virus del amarillamiento de las venas de la papa (PYVV) en la cadena agroalimentaria de la papa en Colombia. El PYVV es transmitido por la mosca blanca de los invernaderos y puede causar pérdidas de hasta el 50 % en cultivos de papa severamente afectados. La más reciente epidemia de PYVV, ocurrida entre 2014 y 2016, fue precedida de un incremento bastante inusual en las poblaciones de *T. vaporariorum* en cultivos de papa. Por tal razón, el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), la autoridad regulatoria del sector agrícola de Colombia, enfocó los esfuerzos al manejo de la mosca blanca de los invernaderos. Las medidas tuvieron pocos efectos inmediatos. Posteriormente, se evidenció que la trasmisión por el vector no podía explicar la distribución de la epidemia a escala nacional. Tan sólo un 27 % de los casos reportados podían ser explicados por la presencia del vector. Es decir, los esfuerzos locales (individuales y colectivos) enfocados al control del vector probablemente estaban contribuyendo muy poco a la solución del problema (Cuadros et al., 2017). Un modo alternativo de trasmisión de PYVV es través de tubérculos infectados que sean usados para semilla. De acuerdo con Cuadros et al. (2017), la estrategia de intervención más efectiva está más relacionada con la calidad del proceso de certificación de semilla y de su apropiada distribución entre las diferentes zonas productoras del país que con el manejo local del vector.

Un nuevo enfoque

A la luz de los factores descritos, el concepto tradicional de MIP, cuyo objetivo principal es reducir la aplicación de insecticidas o sustituirlos por unos menos tóxicos, puede estar fallando en proveer sostenibilidad a los sistemas agrícolas. Por una parte, la capacidad de respuesta ante la aparición de problemas relacionados con plagas (p. ej., resistencia, reemergencia o nuevas regulaciones) se concentra en los procesos que ocurren a escalas institucionales o superiores. La mayor parte del capital se acumula a escalas grandes y, en lugar de enriquecer el capital de los ciclos a escalas de cultivo, se reduce y se limita la capacidad de respuesta del sistema entero a las opciones y el capital de desarrollo e innovación de algunas instituciones. Además, la constante presión del mercado para reducir costos y aumentar producción a corto plazo desestimula la capacidad de respuesta regional de los núcleos de producción ante los problemas de plagas.

En consecuencia, es necesario un enfoque distinto del MIP. Uno cuyo objetivo primordial vaya más allá del manejo responsable de insecticidas químicos o de su sustitución por productos menos tóxicos. Si aceptamos que el objetivo debe ser el incremento en la sostenibilidad de los sistemas agrícolas, el conocimiento y la capacidad de innovación deben ser valorados y distribuidos adecuadamente a través de todas las escalas que involucran la producción agrícola. La clave está en la reducción del enfoque *terapéutico*, para favorecer los métodos basados en la comprensión del ecosistema en su conjunto.

Las instituciones, más que convertirse en proveedores de insumos, deben propender por el desarrollo y la implementación de componentes de manejo que construyan resiliencia en los sistemas agrícolas a escala local. Por un lado, es importante promover los cultivos asociados, de rotación, arreglos multiespecie y multiestrato, y el control biológico y cultural, pues todos estos son vías prácticas para favorecer la diversidad biológica y productiva. Por otro lado, es determinante involucrar a los agricultores en la construcción del conocimiento mediante procesos participativos, con el fin de favorecer la construcción de capacidades de adaptación al cambio. Además, las instituciones públicas y privadas involucradas con la agricultura deben enfocarse en el bien común, en lugar de la sola venta de productos. Estas instituciones también deben propender por la búsqueda de alternativas a la producción orientada a la economía de escala, a través del fomento de economías que satisfagan las necesidades de la población y que favorezcan la diversidad biológica y de mercados.

Ejemplos de implementación exitosa de programas MIP en Colombia

El MIP en cultivos de papa en Colombia

Para el manejo de las principales plagas de la papa en la zona central de Colombia (altiplano cundiboyacense), el Centro Internacional de la Papa (CIP) introdujo en Colombia la estrategia de manejo integrado del gorgojo de los Andes o gusano blanco (como es conocido en Colombia) *Premnotrypes vorax* (Hustache) (Coleoptera: Curculionidae) en la década de los noventa. La estrategia consistía en la divulgación y la validación de un grupo de prácticas gestadas principalmente en el Perú. Estas prácticas incluían: 1) seguimiento y evaluación con zanjas perimetrales, 2) trampas o barreras, y 3) recolección masiva nocturna de adultos. Estrategias similares de múltiples prácticas de control fueron planteadas para otras plagas de la papa en esa región. La apropiación del conocimiento disponible ha conllevado a la formulación de programas de manejo integrado que aún están en proceso de validación completa.

Con base en el reconocimiento de aspectos biológicos y de comportamiento de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Povolný) (Lepidoptera: Gelechiidae) (la otra plaga clave en la mayoría de áreas de esta región), se evaluaron y validaron tecnologías de manejo integrado que incluyen: el aporque con apisonamiento en la corona de la planta (como barrera para disminuir la entrada de larvas pequeñas en la zona de tubérculos), el uso adecuado del riego, la recolección y la disposición adecuada de los residuos de cosecha (López-Ávila & Barreto, 2004).

Se determinó que la época crítica para el ataque de la plaga es a partir de la tuberización y hasta cosecha. Las hembras ovipositan cerca de la base del tallo de las plantas y la mayor cantidad de posturas se presenta al final de la madurez fisiológica (Barreto, 2004). Se evidenció la presencia de enemigos naturales del gusano blanco y de la polilla guatemalteca en Colombia que pueden ser favorecidos con la implementación de programas de MIP en el cultivo (López-Ávila & Espitia-Malagón, 2000). Diferentes cepas de virus y otros microorganismos han sido evaluadas, con un potencial aún por consolidar en cuanto a medidas de manejo prácticas y disponibles para los productores.

Recientemente, se evaluó la integralidad de los componentes y se incorporaron criterios económicos y de impacto ambiental como indicadores de los beneficios de la implementación del MIP en el cultivo de la papa. Los costos de producción se pueden incrementar en parcelas donde se implemente el manejo integrado (especialmente por labores como el seguimiento de plagas), pero la producción y la rentabilidad se ven favorecidas, además de tener menor impacto ambiental por el menor uso de plaguicidas empleados. La tasa de impacto ambiental en los lotes de manejo convencional es tres veces mayor que las de los lotes con MIP evaluados (Espitia, 2014).

Actualmente, el impacto el gusano blanco parece haber disminuido en Colombia, aunque en muchos casos se asocia a la dependencia del control químico. En cambio, la polilla guatemalteca de la papa presenta hoy un comportamiento alternante que se agrava de manera importante en las épocas de sequía (Matheus Gomez, 2005). El alcance de la implementación del MIP logrado hasta ahora está aún por determinar. Dos factores han dificultado esta implementación: la dificultad para disponer de algunos insumos y herramientas de MIP desarrollados y la inestabilidad del valor del producto cosechado, que desestimula la participación de actores de la cadena productiva.

En este proceso dispar de implementación del MIP en papa, la sensibilización de los agricultores incluye estrategias de transferencia del conocimiento de las plagas, especialmente su comportamiento, para entender la aplicabilidad de los componentes del MIP. Los talleres de MIP para agricultores permitieron establecer, con metodologías participativas, la sensibilización de los productores acerca de la importancia de conocer las plagas y la implementación de técnicas de manejo integrado través de este conocimiento (Trillos González, Fierro Guzmán, & Corzo Carrillo, 1997). La implementación del MIP en papa claramente muestra

el beneficio de la disminución en la aplicación de insecticidas, especialmente cuando hay bajos niveles de población de las plagas (Espitia, 2014).

Los factores que puedan contribuir a la implementación de un MIP con enfoque estratégico en la producción de papa en Colombia están aún por evaluarse. Las zonas productoras de papa en Colombia se ubican cerca al centro de origen de la especie y de muchas de sus variedades, y tienen condiciones agrícolas y climáticas afines al cultivo (Castaneda Alvarez et al., 2015). Sin embargo, los factores asociados a la biodiversidad en estos agroecosistemas no se han aprovechado aún en la producción comercial del tubérculo. Los arreglos multiespecie, con cultivos también originarios de estas zonas o con variedades diferentes (pero con atributos complementarios), podrían aportar en la consolidación de un manejo de plagas y enfermedades eficiente y sostenible (Straub & Snyder, 2008; Civitello et al., 2015). Estos arreglos permitirían al sistema, en su conjunto, tener mayor resiliencia frente a factores dominantes externos al sistema, como el clima, el mercado y la desvalorización de la moneda y de los productos cosechados.

Al cultivar en arreglos con diferentes especies de tubérculos andinos se pueden conformar sinergias ecológicas para reducir los ataques de insectos plagas y de enfermedades (Lewis et al., 1997; Clavijo, Barón, & Combariza, 2014), mejorar la dieta de los productores del campo (Burgos, Amoros, Morote, Stangoulis, & Bonierbale, 2007) y conservar un flujo de caja constante, sin depender de uno o de pocos productos. En últimas, esta diversidad, además de sus beneficios agronómicos, favorece la seguridad alimentaria y posibilita el acceso a alimentos más balanceados.

En las décadas iniciales del siglo XXI se vive una etapa crucial para el rescate del conocimiento y el aprovechamiento de especies cultivables autóctonas debido a que la última generación que conoció y aprovechó estos recursos genéticos en su diversidad está pasando (Clavijo et al., 2014). La provisión y el intercambio de alimentos con suficiencia y calidad a nivel local evitará el coste y el gasto ambiental de recurrir a esas fuentes alimentarias desde otras regiones, disminuyendo además la huella de carbón (Hilbert et al., 2016). La recuperación de fincas y veredas con la inclusión de sistemas diversos en las zonas altas de los Andes colombianos (donde se cultiva la papa) daría lugar a la posibilidad de un nuevo arraigo de las comunidades con su territorio.

El MIP en cultivos de habichuela y fríjol en Colombia

A principios de la década de los noventa, se propuso un esquema de manejo integrado de la mosca blanca de los invernaderos en cultivos de fríjol y habichuela. La estrategia de MIP, inicialmente para la región del Sumapaz, parte de la base de un conocimiento de la plaga, de su adaptación en las zonas de impacto, de las alternativas de control y su eficacia (Cardona, Prada, Rodríguez, Ashby, & Quirós, 1991). Incorpora las escalas de evaluación como herramienta que permite detectar claramente la presencia de la plaga, pero induce la tolerancia por debajo de los niveles críticos. La combinación criteriosa de las técnicas de control basadas en el UDE que se confirma con técnicas de seguimiento y valoración de los niveles de población alcanzados muestran un consistente método de control (Cardona et al., 1991).

Algunas empresas de plaguicidas de síntesis química se vienen vinculando a la promoción del MIP. Nuevos productos químicos (según la dinámica de desarrollo por parte de los fabricantes) entran permanentemente al mercado. En esta particular estrategia, las nuevas sustancias son el eje de la recomendación, con el lógico interés promocional y comercial, frecuentemente, sin establecer criterios de UDE. Sin embargo, el enfoque de integralidad que ya adoptan estas empresas es, al menos, una oportunidad para incorporar otras prácticas y el concepto de los niveles de tolerancia por debajo del UDE.

El trabajo conjunto entre el sector privado y el público ha permitido avances importantes en zonas productoras de habichuela y fríjol: la recolección de envases y los programas de capacitación en el uso seguro y eficaz de plaguicidas acompañan fuertemente la implementación del MIP. La creciente aceptación de modelos productivos que sigan las buenas prácticas agrícolas (BPA) también es una oportunidad para la implementación del MIP en su extensión. Los modelos

agronómicos de implementación donde se aplican integralmente las estrategias de MIP con otras del cultivo son cada vez más comunes y consistentes.

El manejo de la broca del café

Originalmente, el café fue concebido como un cultivo inmerso en agroecosistemas ricos en biodiversidad, por lo que inicialmente no se reportaban problemas significativos asociados a plagas. Además, el origen africano del material genético no mostraba susceptibilidad a la entomofauna colombiana. Sin embargo, el ensamblaje de herbívoros se fue adaptando a la concentración de recursos ofrecida por los cultivos de café y, con el tiempo, se fueron registrando varios insectos plaga. Sin embargo, los primeros reportes se mantuvieron generalmente por debajo del UDE.

Desde su aparición en Colombia en 1988, la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae) se convirtió en la especie plaga más importante de este cultivo con una rápida dispersión en el país. La estrategia institucional, desarrollada fundamentalmente por la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia (FNC), se orientó a la búsqueda de métodos de control sostenible y de bajo impacto, con un especial interés en el control cultural y el control biológico. A continuación se describen los pilares del programa de MIP que se diseñó con el objetivo de manejar la broca del café en Colombia (Bustillo, 2008a).

Ya que el café es el principal cultivo de exportación de Colombia, el criterio de mantener la producción de manera competitiva se incorporó a los elementos de MIP. La estrategia generada por la FNC involucra: medidas agronómicas de control preventivo que reducen las poblaciones o previenen el crecimiento de las mismas, y medidas de control cultural, biológico y químico. El control biológico incluye enemigos naturales, primordialmente parasitoides, de la zona de origen de la plaga (África ecuatorial) y enemigos naturales que surgieron en las regiones colombianas de cultivo, principalmente el hongo *Beauveria bassiana*. Los elementos que componen el manejo integrado de la broca (MIB) incluyen: muestreo y UDE, uso de trampas para el monitoreo de poblaciones de la broca, control cultural, el uso de controladores biológicos (por su efecto tanto en los frutos en el árbol como en el suelo), así como el uso de insecticidas (Bustillo, 2008b).

El control cultural es un pilar fundamental en esta estrategia. Aunque es una práctica de difícil implementación, la contribución del control cultural en el MIB es muy clara por su decisivo aporte a la reducción de poblaciones que atacan nuevos frutos. Este control incluye: la recolección de frutos maduros y sobremaduros en rama y suelo, la eliminación total de frutos antes del proceso de renovación, el uso de árboles trampa (que son árboles en los que se dejan todos los frutos en el contorno de lotes soqueados para allí recoger los frutos infestados) y el manejo de frutos atacados en el suelo durante en la cosecha y la poscosecha (Bustillo, 2008b).

La implementación del MIB en los lotes se inicia con la recolección pormenorizada de todos los frutos secos, que se tratan con agua caliente o, si son cantidades grandes, en un silo a 50 °C por 30 minutos. Luego se establece, con base en el seguimiento del cultivo y según las condiciones ambientales, un programa de cosechas oportunas de frutos maduros y sobremaduros con el cual se evita que estos caigan o permanezcan secos en los árboles. La colecta eficiente de frutos caídos, o evitar que estos caigan al suelo, es una medida crucial en este punto. El pase y repase para recoger frutos en rama y la recolección de frutos del suelo se denominó y promocionó con el apelativo de "Re-Re" (Bustillo, 2008b).

Se deben realizar las evaluaciones en los lotes para determinar el estado de infestación. La técnica de evaluación recomendada es la de la rama, en la cual se deben tomar 30 sitios/ha ubicados de manera representativa en todo el lote. En cada sitio se toma una rama en un árbol determinado, que tenga una zona de producción con 30 a 100 frutos. Se cuenta la cantidad de frutos brocados. El umbral para el control químico se estableció en el 2 %. El muestreo en los 30 sitios/ha permite además detectar focos donde se deben concentrar las acciones de control y seguimiento. Si se ha aplicado un control químico, se debe hacer evaluación para determinar el porcentaje de supresión alcanzado (Bustillo, 2008a).

El uso de los entomopatógenos se recomienda para niveles de infestación cercanos al del UE. Se recomienda

tratar tanto los árboles como el suelo en el contorno. La liberación de avispas parasitoides es principalmente recomendada al final de la cosecha para controlar las brocas en los frutos que permanecen en los lotes. Las medidas de control incluyen también el manejo poscosecha que se basa en evitar que los adultos de la broca regresen a los lotes, aislando su posible salida en todas las fases del proceso de beneficio del grano (Bustillo, 2008a).

Durante el periodo de soqueo, la instalación de árboles trampa ha permitido concentrar y controlar los adultos remanentes en el lote. Se permite la llegada de los adultos a los frutos de estos árboles, y luego estos se tratan adecuadamente. Los frutos del café soqueado que se encuentran en el suelo se asperjan tanto como sea necesario con el hongo *Beauveria bassiana* (Bustillo, 2008a).

El MIB incluye prácticas que se relacionan con otros componentes del cultivo: el uso de variedades resistentes a la roya para disminuir las aplicaciones de fungicidas, la disposición alineada de árboles en el lote para facilitar el manejo agronómico y cultural, la renovación periódica y oportuna de los lotes, el manejo selectivo de arvenses (que favorece la fauna benéfica) y el beneficio ecológico del café, que reduce el escape de la broca hacia los lotes. La implementación del MIB se ha traducido en una disminución significativa del daño y las pérdidas ocasionadas por la plaga. La adopción de esta estrategia ha sido relativamente alta en Colombia (> 60 % de apropiación entre los productores), al punto en que se considera un caso especialmente exitoso de implementación de MIP en el país (Bustillo, 2008b).

Una recuperación balanceada de los arreglos multiespecie asociados al cultivo de café permitiría aprovechar el servicio ambiental de esos arreglos en la disminución de la incidencia de plagas. Para implementarlos, las zonas cafeteras colombianas cuentan con el clima, los suelos y recursos genéticos abundantes.

Conclusiones

En Colombia, los sistemas agrícolas se desarrollan en un entorno ambiental y socioeconómico cambiante y difícil de predecir. Esta incertidumbre del entorno expone a todos los sistemas agrícolas a factores de colapso, tales como la invasión de plagas, el incremento en precios de insumos clave o la disminución del valor de los productos en el mercado. La invasión de plagas en cultivos de papa y café y la inestabilidad de precios del café, el frijol y la papa en el mercado son ejemplos claros de factores que constantemente incrementan la vulnerabilidad de estos sistemas en el país. La naturaleza impredecible de los factores de colapso provenientes del entorno exige una capacidad de respuesta por parte de todos los actores del sistema que involucre una amplia diversidad de estrategias. En el caso del ataque de plagas, por ejemplo, la capacidad de respuesta no solo debe incluir medidas de prevención y control a diferentes escalas espaciales y temporales, sino una distribución homogénea de oportunidades para la innovación constante de estrategias entre los diferentes actores del sistema. Las capacidades de innovación son especialmente necesarias para sistemas de cultivo que, por alguna razón, compiten con sistemas convencionales de altísima rentabilidad en un mercado global. En estos casos, la implementación de estrategias de manejo sostenibles requiere de la creación e identificación coordinada de vías de producción y mercado que valoren el enorme beneficio ambiental que supone la producción de bienes en agroecosistemas amigables para todos.

El paradigma del MIP, entendido como la definición de umbrales para reducir la aplicación de insecticidas químicos o su sustitución por sustancias menos tóxicas, es insuficiente para la construcción de sistemas agrícolas sostenibles. Los ejemplos de programas de MIP exitosos en Colombia evidencian tres características comunes que incrementan la probabilidad de adopción y éxito: 1) investigación científica enfocada en la comprensión del agroecosistema, 2) la incorporación del criterio de niveles de tolerancia de poblaciones bajas de plagas por debajo del umbral de acción, y 3) un enfoque de trabajo participativo con los productores. Por su parte, la incorporación de métodos de control biológico en programas de MIP debe evitar el enfoque *terapéutico* tradicional, para orientarse más hacia el fortalecimiento del capital de los sistemas agrícolas a escala local y regional. Esta meta aún requiere de mucho trabajo para ser alcanzada, e implicará cambios tecnológicos, políticos y estructurales. La formulación de políticas eficientes, que promuevan la conservación y el uso apropiado de la biodiversidad, y la distribución justa del conocimiento y de las capacidades de innovación son excelentes puntos de partida.

Agradecimientos

Los autores estamos agradecidos con Carolina Camargo (Universidad de Antioquia - Sociedad Max Planck), H. Fernando Rivera y Diego F. Sánchez (AGROSAVIA) por las ilustradas discusiones que llevaron al discernimiento de las ideas presentadas en este capítulo. El apoyo salarial y para la investigación de Casey W. Hoy se proporciona con fondos estatales y federales de los EE. UU. asignados al Ohio Agricultural Research and Development Center (OARDC) de Ohio State University. Los autores asumimos total responsabilidad por la interpretación de los resultados y las ideas presentadas.

Referencias

Barreto, N. (2004). Nuevos aportes al conocimiento y manejo integrado de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Povolny) en Colombia. En Sociedad Colombiana de Entomología (Socolen), *Memorias XXXI Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología* (pp. 93-100). Bogotá, Colombia: Socolen.

Begon, M., Townsend, C. R., & Harper, J. L. (2006). *Ecology: from individuals to ecosystems*. Malden, EE. UU.: Blackwell Publishers.

Berkes, F. (2007). Understanding uncertainty and reducing vulnerability: lessons from resilience thinking. *Natural Hazards, 41*(2), 283-295. doi:10.1007/s11069-006-9036-7.

Binns, M. R., & Nyrop, J. P. (1992). Sampling insect populations for the purpose of IPM decision-making. *Annual Review of Entomology, 37*, 427-453. doi:10.1146/annurev.en.37.010192.002235.

Binns, M. R., Nyrop, J. P., & Werf, W. (2000). *Sampling and monitoring in crop protection: the theoretical basis for developing practical decision guides*. Wallingford, Reinio Unido: CABI Publishing.

Bolker, B. M. (2008). *Ecological models and data in R*. Princeton, EE. UU.: Princeton University Press.

Brewer, M. J., & Goodell, P. B. (2012). Approaches and incentives to implement integrated pest management that addresses regional and environmental issues. *Annual Review of Entomology, 57*, 41-59. doi:10.1146/annurev-ento-120709-144748.

Burgos, G., Amoros, W., Morote, M., Stangoulis, J., & Bonierbale, M. (2007). Iron and zinc concentration of native Andean potato cultivars from a human nutrition perspective. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 87*(4), 668-675. doi:10.1002/jsfa.2765.

Bustillo, A. E. (2008a). Aspectos sobre la broca del café *Hypotenemus hampei* en Colombia. En A. E. Bustillo (Ed.), *Los insectos y su manejo en la caficultura colombiana* (pp. 388-418). Chinchiná, Colombia: Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé).

Bustillo, A. E. (2008b). El manejo de cafetales y el control de la broca del café. En A. E. Bustillo (Ed.), *Los insectos y su manejo en la caficultura colombiana* (pp. 419-426). Chinchiná, Colombia: Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé).

Cardona, C., Prada, P., Rodríguez, A., Ashby, J., & Quirós, C. (1991). *Bases para establecer un programa de manejo integrado de plagas de habichuela en la provincia de Sumapaz (Colombia)*. [Documento de Trabajo Nº 86]. Recuperado http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/Digital/SB608.B3_B38C.2_Bases_para_establecer_un_programa_de_manejo_integrado_de_plagas_de_habichuela.pdf.

Castaneda Alvarez, N., Haan, S., Juarez, H. , Khoury, C. K., Achicanoy, H., Sosa Arango, C., … Spooner, D. M. (2015). *Ex situ* conservation priorities for the wild relatives of potato (*Solanum* L. section *Petota*). *Plos One, 10*(4), e0122599. doi:10.1371/journal.pone.0122599.

Civitello, D. J., Cohen, J., Fatima, H., Halstead, N. T., Liriano, J., McMahon, T. A., … Rohr, J. R. (2015). Biodiversity inhibits parasites: Broad evidence for the dilution effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 112*(28), 8667-8671. doi:10.1073/pnas.1506279112.

Clavijo, N., Barón, M., & Combariza, J. (2014). *Tubérculos andinos: conservación y uso desde una perspectiva agroecológica.* Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.

Coble, H. D., & Ortman, E. E. (2008). The USA National IPM Road Map. En E. B. Radcliffe, R. E. Cancelado, & W. D. Hutchison (Eds.), *Integrated Pest Management: Concepts, Tactics, Strategies and Case Studies* (pp. 471-478). Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press.

Courtier-Orgogozo, V., Morizot, B., & Boëte, C. (2017). Agricultural pest control with CRISPR-based gene drive: time for public debate. Should we use gene drive for pest control? *EMBO Reports 18*(6), 878-880. doi:10.15252/embr.201744205.

Cuadros, D. F., Hernández, A., Torres, M. F., Torres, D. M., Branscum, A. J., & Rincon, D. F. (2017). Vector Transmission Alone Fails to Explain the Potato Yellow Vein Virus Epidemic among Potato Crops in Colombia. *Frontiers in Plant Science, 8*, 1654. doi:10.3389/fpls.2017.01654.

Chao, A., & Just, L. (2012). Diversity measures. En A. Hastings, & L. Gross (Eds.), *Encyclopedia of Theoretical Ecology* (pp. 203-207). Berkeley, EE. UU.: University of California Press.

Christou, P., Capell, T., Kohli, A., Gatehouse, J. A., & Gatehouse A. M. R. (2006). Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. *Trends in Plant Science, 11*(6), 302-308. doi:10.1016/j.tplants.2006.04.001.

Diamond, J. M. (2005). *Collapse: How Societies Choose to Fail or Succeed*. Nueva York, EE. UU.: Viking.

Epstein, L., & Bassein, S. (2003). Patterns of pesticide use in california and the implications for strategies for reduction of pesticides. *Annual Review of Phytopathology, 41*, 351-375. doi:10.1146/annurev.phyto.41.052002.095612.

Espitia, E. (2014). *Estrategias evaluadas de manejo integrado de las limitantes tecnológicas del cultivo de la papa con miras a obtener un producto limpio (año uno)*. [Informe técnico final de producto]. Mosquera, Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica), Centro de Investigación Tibaitatá.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2016). *Pesticides Use database*. Recuperado de http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP.

Folke, C., Hahn, T., Olsson, P. & Norberg, J. (2005). Adaptive governance of social-ecological systems. *Annual Review of Environment and Resources, 30*, 441-473. doi:10.1146/annurev.energy.30.050504.144511.

Gilpin, R. (2000). *The Challenge of Global Capitalism: The World Economy in the 21st Century*. Princeton, EE. UU.: Princeton University Press.

Gordon, K. H. J., & Waterhouse, P. M. (2007). RNAi for insect-proof plants. *Nature Biotechnology, 25*(11), 1231-1232. doi:10.1038/nbt1107-1231.

Gray, M. E., Ratcliffe, S. T., & Rice, M. E. (2008). The IPM paradigm: concepts, strategies and tactics. En E. B. Radcliffe, R. E. Cancelado, & W. D. Hutchison (Eds.), *Integrated Pest Management: Concepts, Tactics, Strategies and Case Studies* (pp. 1-13). Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press.

Hilbert, N., Evans-Cowley, J., Reece, J., Rogers, C., Ake, W., & Hoy, C. (2016). Mapping the Cost of a Balanced Diet, as a Function of Travel Time and Food Price. *Journal of Agriculture, Food Systems, and Community Development, 5*(1), 105-127. doi:10.5304/jafscd.2014.051.010.

Hill, M. P., Macfadyen, S., & Nash, M. A. (2017). Broad spectrum pesticide application alters natural enemy communities and may facilitate secondary pest outbreaks. *PeerJ, 5*, e4179. doi:10.7717/peerj.4179.

Holling, C. S. (1973). Resilience and stability of ecological systems. *Annual Review of Ecology and Systematics, 4*, 1-23. doi:10.1146/annurev.es.04.110173.000245.

Holling, C. S. (1985). Resilience of ecosystems: local surprise and global change. En W. C. Clark, & R. Munn (Eds.), *Sustainable development of the biospher* (pp. 292-317). Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press.

Holling, C. S., & Gunderson, L. H. (2002). *Panarchy: Understanding Transformations in Human and Natural Systems*. Washington , EE. UU.: Island Press.

Hoy, C. W. (2008). Pesticide resistance management. En E. B. Radcliffe, R. E. Cancelado, & W. D. Hutchison (Eds.), *Integrated Pest Management: Concepts, Tactics, Strategies and Case Studies* (pp. 192-204). Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press.

Hoy, C. W., Jennison, C., Shelton, A. M., & Andaloro, J. T. (1983). Variable-intensity sampling - a new technique for decision-making in cabbage pest-management. *Journal of Economic Entomology, 76*(1), 139-143.

Hoy, C. W., McCulloch, C. E. , Sawyer, A. J., Shelton, A. M., & Shoemaker, C. A. (1990). Effect of Intraplant Insect Movement on Economic Thresholds. *Environmental Entomology, 19*(5), 1578-1596. doi:10.1093ee/19.5.1578.

Iwao, S. (1975). A new method of sequential sampling to classify populations relative to a critical density. *Researches on Population Ecology, 16*(2), 281-288. doi:10.1007/BF02511067.

Kendal, W. S. (2004). Taylor's ecological power law as a consequence of scale invariant exponential dispersion models. *Ecological Complexity, 1*(3), 193-209.

Levins, R. (2007). From simple IPM to the management of agroecosystems. En M. Kogan, & P. Jepson (Eds.), *Perspectives in Ecological Theory and Integrated Pest Management* (pp. 45-64). Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press.

Lewis, W. J., Van Lenteren, J. C., Phatak, S. C., & Tumlinson, J. H. (1997). A total system approach to sustainable pest management. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(23), 12243-12248.

López-Ávila, A., & Espitia-Malagón, E. (2000). *Plagas y benéficos en el cultivo de la papa en Colombia.* [Boletín técnico divulgativo]. Bogotá, Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica).

López-Ávila, A., & Barreto, N. (2004). *Generación de componentes tecnológicos para el manejo integrado de la polilla gutatemalteca de la papa Tecia solanivora (Povolny) con base en el conocimiento de la biología, comportamiento y dinámica de población de la plaga* [Informe Técnico]. Bogotá, Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica).

Madden, L. V., Hughes, G., & Bosch, F. v. d. (2007). *The study of plant disease epidemics*. Saint Paul, EE. UU.: American Phytopathological Society.

Matheus Gomez, H. (2005). Sistema de vigilancia fitosanitaria para la polilla guatemalteca de la papa en Colombia. En A. Lopez-Ávila (Ed.), *Memorias: III Taller Internacional sobre la polilla guatemalteca de la papa*, Tecia solanivora (pp. 17-23). Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP).

Metcalf, R. (1994). Insecticides in pest management. En R. L. Metcalf, & W. H. Luckmann (Eds.), *Introduction to Insect Pest Management* (pp. 245-312). Nueva York, EE. UU.: John Wiley & Sons.

Michel, A., & Shaked, I. (1984). Does business diversification affect performance? *Financial Management*, *13*(4), 18-25.

Morse, S. (2008). IPM: ideals and realities in developing countries. En E. B. Radcliffe, R. E. Cancelado, & W. D. Hutchison (Eds.), *Integrated Pest Management: Concepts, Tactics, Strategies and Case Studies* (pp. 458-470). Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press.

Naranjo, S. E., & Ellsworth, P. C. (2009). Fifty years of the integrated control concept: moving the model and implementation forward in Arizona. *Pest Management Science*, *65*(12), 1267-1286. doi:10.1002/ps.1861.

Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*, *144*(1), 31-43. doi:10.1017/S0021859605005708.

Pedigo, L. P., & Rice, M. E. (2014). *Entomology and Pest Management* [6.a ed.]. Long Grove, EE. UU.: Waveland Press.

Pedigo, L. P., Hutchins, S. H., & Higley, L. G. (1986). Economic injury levels in theory and practice. *Annual Review of Entomology*, *31*, 341-368. doi:10.1146/annurev.en.31.010186.002013.

Rumelt, R. P. (1982). Diversification strategy and profitability. *Strategic Management Journal*, *3*(4), 359-369. doi:10.1002/smj.4250030407.

Sommer, U., Adrian, R., Domis, L. D. S., Elser, J. J., Gaedke, U., Ibelings, B., … Winder, M. (2012). Beyond the

plankton ecology group (PEG) model: mechanisms driving plankton succession. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *43*, 429-448. doi:10.1146/annurev-ecolsys-110411-160251.

Stern, V. M., Smith, R. F., Van den Bosch, R. & Hagen, K. S. (1959). The integration of chemical and biological control of the spotted alfalfa aphid: The integrated control concept. *Hilgardia*, *29*(2), 81-101. doi:10.3733/hilg.v29n02p081.

Straub, C. S., & Snyder, W. E. (2008). Increasing enemy biodiversity strengthens herbivore suppression on two plant species. *Ecology*, *89*(6), 1605-1615. Recuperado de https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1890/07-0657.1.

Taylor, L. R., Woiwod, I. P., & Perry, J. N. (1978). Density-dependence of spatial behavior and rarity of randomness. *Journal of Animal Ecology*, *47*(2), 383-406. doi:10.2307/3790.

Taylor, R. A. J., Lindquist, R. K., & Shipp, J. L. (1998). Variation and consistency in spatial distribution as measured by Taylor's power law. *Environmental Entomology*, *27*(2), 191-201. doi:10.1093/ee/27.2.191.

Thomas, M. B. (1999). Ecological approaches and the development of "truly integrated" pest management. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(11), 5944-5951. doi:10.1073/pnas.96.11.5944.

Trillos González, O., Fierro Guzmán, L. H., & Corzo Carrillo, P. J. (1997). *Metodología para un curso-taller de manejo integrado de plagas en la papa* [Boletin técnico Corpoica N.º 1]. Recuperado de https://es.scribd.com/document/22297657/Metodologia-para-un-curso-taller-de-manejo-integrado-de-plagas-en-la-papa.

Turner, B. L., Kasperson, R. E., Matson, P. A., McCarthy, J. J., Corell, R. W., Christensen, L., … Schiller, A. (2003). A framework for vulnerability analysis in sustainability science. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(14), 8074-8079. doi:10.1073/pnas.1231335100.

Van Lenteren, J. C. (2009). IPM in greenhouse vegetables and ornamentals. En E. B. Radcliffe, W. D. Hutchison, & R. E. Cancelado (Eds.), *Integrated Pest Management: Concepts, Tactics, Strategies and Case Studies* (pp. 354-365). Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press.

Van Lenteren, J. C., & Woets, J. (1988). Biological and integrated pest control in greenhouses. *Annual Review of Entomology*, *33*, 239-269. doi:10.1146/annurev.en.33.010188.001323.

Wald, A. (1945). Sequential Tests of Statistical Hypotheses. *The Annals of Mathematical Statistics*, *16*(2), 117-186. doi:10.1214/aoms/1177731118.

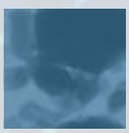
Walker, B., Holling, C. S., Carpenter, S. R., & Kinzig, A. (2004). Resilience, adaptability and transformability in social-ecological systems. *Ecology and Society*, *9*(2), 5. Recuperado de https://www.ecologyandsociety.org/vol9/iss2/art5/.

Sección IV

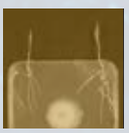
El futuro del control biológico

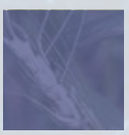
Capítulo 19
Los hongos endófitos en el
control biológico de fitopatógenos e insectos plagas

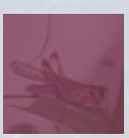
Capítulo 20
Nuevas estrategias para
el control biológico de fitopatógenos


Capítulo 21
Nuevas estrategias para
el control biológico de insectos

Capítulo 22
Las ómicas
en el control biológico


Capítulo 23
Los volátiles microbianos y su potencial
en el control biológico de fitopatógenos e insectos


Capítulo 24
Cambio climático, epidemiología vegetal
y control biológico de fitopatógenos


Capítulo 25
Cambio climático y control biológico
de insectos: visión y perspectiva de la situación

Capítulo 19

Los hongos endófitos en el control biológico de fitopatógenos e insectos plaga

Chapter 19

Endophytic fungi in biological control of phytopathogens and insect pests

Sandra M. Aragón,[1] Camilo Beltrán-Acosta[1]

[1] Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA)

Contenido

Introducción 854

Biología de los hongos endófitos 854

Mecanismos de acción 855

- Control biológico de fitopatógenos 856
- Control biológico de insectos plaga 858

Patrones de colonización 862

- Técnicas tradicionales de reaislamiento de hongos endófitos 863
- Técnicas moleculares para la detección de endófitos *in planta* 864

Casos exitosos 865

- Productos comerciales a base de hongos endófitos 866
- Formulación y técnicas de aplicación 869

Conclusiones y perspectivas 871

Agradecimientos 872

Referencias 873

Resumen

Los endófitos constituyen un grupo de microorganismos que viven dentro de las plantas, los cuales mantienen asociaciones ligeramente perceptibles con sus plantas hospederas por al menos parte de su ciclo de vida. Su amplia biodiversidad, así como su capacidad de síntesis de metabolitos secundarios, promoción de crecimiento e inducción de resistencia sistémica, entre otras características, hacen de los hongos endófitos una alternativa de alto potencial para su aplicación en el manejo de insectos plaga y enfermedades en cultivos de importancia agrícola en Colombia y en el resto del mundo. Sin embargo, el estudio de microorganismos endófitos es un área relativamente nueva en la investigación: su biología y las bases moleculares de la interacción planta-endófito se encuentran aún poco exploradas para el caso de los hongos que colonizan plantas vasculares, lo cual reduce el espectro de desarrollo de nuevos productos a base de endófitos, dada la dificultad de generar una formulación que garantice la permanencia del hongo fuera de la planta hospedera y permita la penetración del mismo en diferentes momentos de desarrollo de esta. En este capítulo, se tratarán temas relacionados con su mecanismo de acción, patrones de colonización, formulación y técnicas de aplicación en campo y algunos casos exitosos del uso de hongos endófitos comercialmente disponibles para el manejo de algunos fitopatógenos e insectos plaga.

Palabras clave

Agente de control biológico, formulación, interacción planta-endófito, mecanismos de acción

Abstract

The endophytes constitute a group of microorganisms living inside plant tissues which maintain slightly perceptible associations with their host plants for at least part of their life cycle. Its wide biodiversity, as well as its ability to synthesize secondary metabolites, growth promotion, systemic induced resistance, among other characteristics, make endophytic fungi as a high potential alternative for its application in the management of pests and diseases in crops of agricultural importance in Colombia and the rest of the world. However, the study of endophytic microorganisms is a relatively new area in research, and its biology and the molecular basis of the plant-endophyte interaction are still hardly explored for the case of those fungi that can colonize vascular plants, which in turn reduces the spectrum of fungal species used for the development of new products based on endophytes given the difficulty of developing a formulation that guarantees the permanence of the fungus outside the plant and allows the penetration at different times of development of the host plant. In this chapter, issues related to endophytes mechanisms of action, colonization patterns, formulation and application techniques in the field and some successful cases of the use of endophyte fungi commercially available for the management of some phytopathogens and insect pests will be addressed.

Keywords

Biological control agent, formulation, mechanisms of action, plant-endophyte interaction

Introducción

En la década de los noventa, el comité de micología de la Sociedad Americana de Fitopatología (APS, por su sigla en inglés) organizó una de las primeras sesiones de discusión acerca de la aparición de hongos endófitos en plantas leñosas y gramíneas (Backman & Sikora, 2008). Esta discusión dio inicio a una serie de publicaciones que buscaban darle visibilidad ante la comunidad científica al fenómeno del endofitismo en estas especies.

Es así como en 1996 se publicó el libro acerca de la ecología y evolución de los endófitos editado por Scott y Carris (1996). Para ese entonces, la mayoría de la información recopilada hacía referencia a los hongos clavicipitáceos, los cuales, con frecuencia, se relacionaron con la reducción de la herbivoría en pastos, producida por insectos y algunos mamíferos (Saikkonen et al., 1996).

Los endófitos se definen como microorganismos que viven durante todo o parte de su ciclo de vida dentro de los tejidos de plantas vivas sin ocasionar ningún síntoma o efecto negativo en su planta hospedera y cuya colonización interna es demostrable (Rodriguez, White, Arnold, & Redman, 2009; Saikkonen, Faeth, Helander, & Sullivan, 1998; Schulz & Boyle, 2006; Stone, Bacon, & White, 2000). Los hongos endófitos pueden distinguirse de las micorrizas por la ausencia de estructuras externas como hifas o micelio (Saikkonen et al., 1998); además, cuentan con capacidad para explotar diferentes fuentes nutricionales (Ownley, Gwinn, & Vega, 2010).

Biología de los hongos endófitos

Los hongos endófitos representan un continuo de hongos con respecto a su estado fisiológico, modo de infección, patrón de colonización, metabolismo secundario, estrategia de historia de vida y etapas de desarrollo y evolución, pero también con respecto a la categoría taxonómica del hongo y del hospedero implicados en la simbiosis (Schulz & Boyle, 2005). Las interacciones endófito-hospedero no son neutras, sino que implican un equilibrio de antagonismos que es independiente del órgano de la planta que esté infectado (Schulz & Boyle, 2005).

La clasificación funcional de los endófitos se basó en la filogenia y las características del ciclo de vida, y fueron asociados en dos grupos: los endófitos clavicipitáceos que se recuperan de algunas gramíneas y los endófitos no clavicipitáceos que se recuperan de tejidos asintomáticos de plantas no vasculares, helechos y plantas relacionadas, coníferas y angiospermas (Rodriguez et al., 2009).

Los endófitos clavicipitáceos (o clase 1) constituyen un pequeño número de especies de hongos dentro de la familia Clavicipitaceae que están relacionados filogenéticamente y cuya transmisión es principalmente vertical, donde las plantas madre transmiten los hongos a las plantas hijas a través de semillas infectadas (Saikkonen, Ion, & Gyllenberg, 2002). Estos se limitan a algunas gramíneas de zonas templadas, se encuentran dentro de los brotes de las plantas y forman infecciones intercelulares sistémicas (Bischoff & White, 2005).

Los hongos endófitos de la clase 1 frecuentemente estimulan el desarrollo de la biomasa de la planta, le confieren tolerancia a la sequía y producen compuestos químicos que son tóxicos para los animales que las consumen, reduciendo así la herbivoría (Clay & Schardl, 2002). Sin embargo, los beneficios conferidos por estos hongos parecen depender de la especie huésped, de su genotipo y de las condiciones ambientales (Faeth et al., 2006; Faeth & Sullivan, 2003; Saikkonen, Helander, Faeth, Schulthess, & Wilson, 1999). Clay y Schardl (2002) dividen los endófitos clavicipitáceos en tres tipos:

- Tipo 1: su ciclo de vida incluye especies sintomáticas y patogénicas, e implica la propagación del hongo

por ascosporas y la esterilización reproductiva del huésped. Los hongos son heterotálicos y requieren transferencia de espermacios entre tipos de apareamiento para una reproducción exitosa (Clay & Schardl, 2002).

- Tipo II: la reproducción de endófitos que infectan las gramíneas puede ser extremadamente plástica. En plantas individuales colonizadas, se pueden producir simultáneamente cuerpos fructíferos del hongo e inflorescencias de la planta y se describe como un mecanismo de interacción mixta (Clay & Schardl, 2002). Los hongos endófitos que producen este estado mixto se denominan *simbiontes pleiotrópicos* porque se transmiten verticalmente a través de semillas y horizontalmente por esporas (Schardl et al., 1997, citado por Clay & Schardl, 2002).
- Tipo III: estos permanecen dentro del tejido vegetal durante toda su vida, incluso durante la floración del hospedero, y presentan ciclo de vida asintomático. No producen esporas sexuales (ascosporas), por lo que no existe un mecanismo regular de recombinación genética para el hongo (Clay & Schardl, 2002). Los linajes de genotipos únicos de hongos se transmiten verticalmente a través de semillas por crecimiento de hifas en óvulos en desarrollo, proporcionando mayores oportunidades para las interacciones coevolutivas (Freeman, 1904, citado por Clay & Schardl, 2002).

De igual manera, los endófitos no clavicipitáceos (ENC) son altamente diversos y se subdividen en tres clases funcionales según los patrones de colonización del hospedero, su mecanismo de transmisión entre las generaciones del huésped (características del ciclo de vida), los niveles de biodiversidad *in planta* y los beneficios e interacción aportados al hospedero (importancia y función ecológica) (Rodriguez et al., 2009).

Los ENC de la clase 2 pueden crecer extensamente tanto en tejidos por encima como por debajo del nivel del suelo, pero su diversidad es limitada (Rodriguez et al., 2009). En la clase 3 los ENC están altamente localizados y restringidos a los tejidos que se encuentran encima del suelo, pero su diversidad es alta (> 20 especies registradas a partir de una hoja) (Arnold et al., 2003). La clase 4 coloniza extensamente la raíz y su diversidad no ha sido determinada (Rodriguez et al., 2009).

También existen diferencias en la colonización del hospedero y en el modo de trasmisión. La clase 2 se transmite verticalmente (por semillas y sus partes, o por rizomas) y horizontalmente; además tiene capacidad de conferirle tolerancia a la planta hospedera frente al estrés específico del hábitat (pH, temperatura y salinidad) y de mejorar su crecimiento y la tolerancia al estrés hídrico (tolerancia a la sequía), así como ante factores no específicos del hábitat (Rodriguez et al., 2009). En contraste, las clases 3 y 4 solamente se transmiten de manera horizontal y le confieren beneficios al hospedero, ya que mejoran su crecimiento y su tolerancia a la sequía (Rodriguez et al., 2009).

Mecanismos de acción

Diferentes mecanismos de acción y aplicaciones de los microorganismos endófitos han sido descritos en la última década. Algunos de los beneficios de los endófitos en sus plantas hospederas se encuentran resumidos en la figura 19.1.

Los microorganismos endófitos pueden inducir la expresión de genes en las plantas para la producción de metabolitos secundarios en estas o en el medio donde se desarrollan, los cuales pueden ser extraídos para diferentes propósitos. Adicionalmente, estas sustancias pueden interferir con organismos potencialmente patógenos de la planta hospedera y pueden inducir resistencia a enfermedades, mayor tolerancia a factores abióticos y cambio en la calidad de los productos de la planta.

Por lo tanto, los hongos endófitos pertenecen al grupo de agentes de control biológico microbianos en la regulación EU 1107/200 (Camino-Sánchez et al., 2011). Estos se definen como cualquier ente microbiológico, incluidos los virus y los hongos inferiores, celulares o no celulares, capaces de replicarse o de transferir material genético (Feldmann & Hommes, 2013).

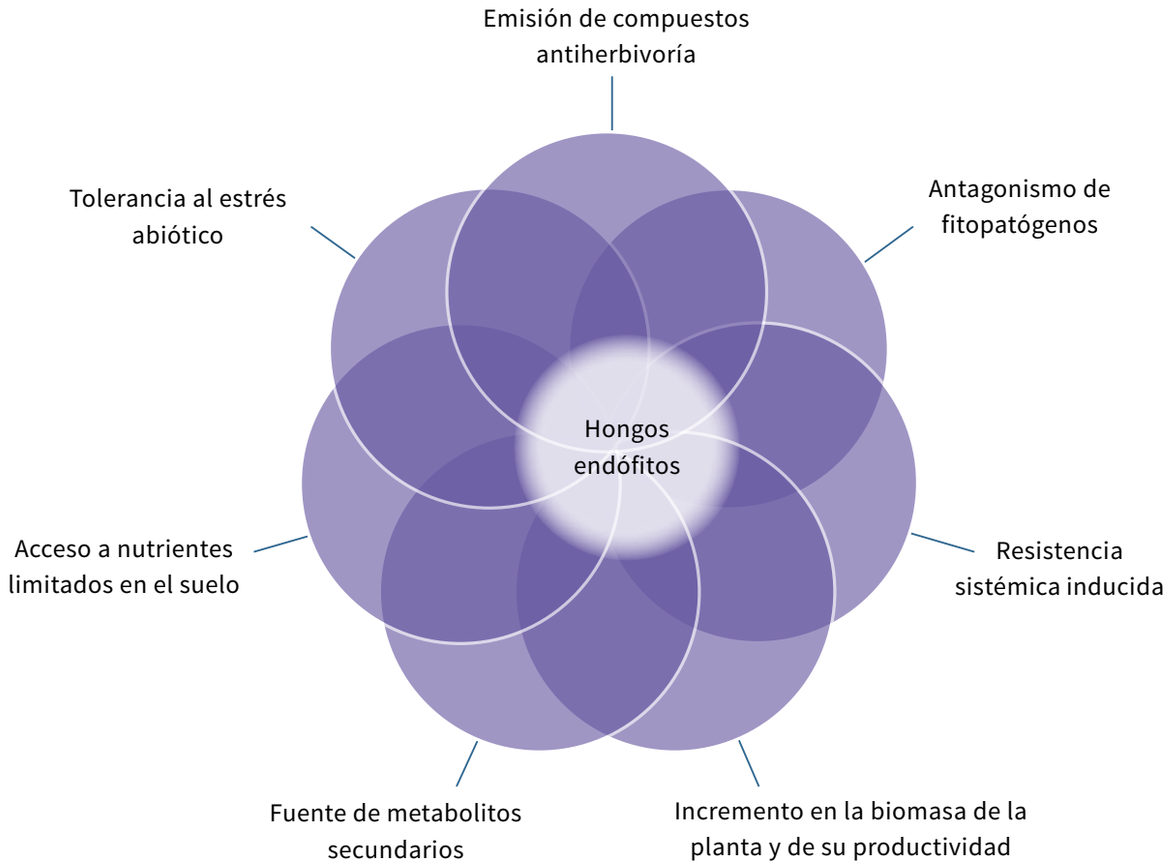


Figura 19.1. Efectos de la inoculación de plantas con hongos endófitos.

Fuente: Elaboración propia

Frente a un insecto plaga o un patógeno específico, los microorganismos endófitos pueden presentar uno o más mecanismos de acción que están relacionados con su capacidad como agentes de control biológico. Se agrupan principalmente en *mecanismos químicos o indirectos*, los cuales se dan por la producción de metabolitos primarios, metabolitos secundarios, enzimas o por compuestos orgánicos volátiles (VOC, por su sigla en inglés) efectivos que limitan e inhiben a un patógeno en particular u otros hongos endófitos competidores (Herre et al., 2007). Dentro de esta categoría se encuentran tres mecanismos específicos: 1) antibiosis, 2) competencia y 3) inducción de resistencia (Card, Johnson, Teasdale, & Caradus, 2016; Herre et al., 2007). El segundo grupo son los *mecanismos físicos o directos* que se generan por las interacciones de contacto entre hifas y células, conocido como *parasitismo directo* o *micoparasitismo* (Card et al., 2016; Herre et al., 2007).

Control biológico de fitopatógenos

Los endófitos pueden producir metabolitos secundarios que le confieren resistencia al hospedero contra factores bióticos como enfermedades causadas por nematodos, bacterias y hongos patógenos (Rodriguez et al., 2009).

Mecanismo indirecto, efecto de los VOC en el manejo de fitopatógenos

Un ejemplo de mecanismo indirecto es el caso de *Muscodor yucatanensis*, hongo endófito aislado de hojas del árbol *Bursera simaruba* (Burseraceae), que

produce una mezcla de voc identificados como octano, 2-pentilfurano, cariofileno, aromadendreno y derivados del naftaleno (Macías-Rubalcava et al., 2010), obtenidos de los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio de 15 días de crecimiento. Estos compuestos fueron efectivos contra diferentes microorganismos fitopatógenos, como *Colletotrichum* sp., *Phomopsis* sp., *Alternaria solani*, *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora capsici* y *Phytophthora parasitica*. Algunos de los voc presentan también efectos aleloquímicos que generan inhibición en el crecimiento de la raíz de algunas especies vegetales como amaranto y tomate (Sánchez-Fernández et al., 2013; Macías-Rubalcava et al., 2010).

Tolerancia al estrés biótico y abiótico

El endófito *Piriformospora indica*, aislado de una espora de una micorriza arbuscular obtenida del suelo rizosférico de los arbustos *Prosopis juliflora* y *Ziziphus nummularia* en arenas del desierto en la India (Verma et al., 1998), indujo tolerancia al estrés salino moderado (100 mM de NaCl) en plántulas de cebada (*Hordeum vulgare*) luego de cuatro semanas de haberlas inoculado con el endófito. Estas plántulas, además, fueron más resistentes a los patógenos *Fusarium culmorum* y *Cochliobolus sativus* que afectan la raíz y causan importantes pérdidas económicas (Kumar et al., 2002). Dicho tratamiento, además, estimuló la producción de biomasa en comparación con el control, lo que dio lugar a un aumento general en el rendimiento de grano (Waller et al., 2005).

Así mismo, las raíces de las plantas colonizadas por *P. indica* mostraron mayor capacidad antioxidante debido a que las concentraciones de ácido ascórbico y de dehidroascorbato reductasa aumentaron sistemáticamente en las tres primeras semanas, lo cual sugiere que los niveles altos de estos antioxidantes, y en especial del ascorbato presente en las raíces, las protegen de la muerte celular provocada por los patógenos *F. culmorum* y *C. sativus* (Waller et al., 2005).

P. indica generó respuestas de defensa por resistencia sistémica inducida que se expresó en las hojas de cebada en las que se observó un 58 % de reducción de la infección causada por el mildeo polvoso, causado por *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Erysiphales), y se encontraron frecuencias más altas de respuesta de reacción celular hipersensible, incluyendo muerte celular, lo que confirma que el patógeno evaluado fue controlado por una respuesta activa de la planta (Waller et al., 2005).

Competencia por nichos y nutrientes

Bolwerk, Lagopodi, Lugtenberg y Bloemberg (2005) evaluaron la cepa no patogénica Fo47 de *Fusarium oxysporum*, la cual inhibe a *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* reduciendo los síntomas de la pudrición de la raíz y el cuello del tallo, observados simultáneamente en la raíz del tomate, para lo cual se necesita una concentración 50 veces mayor de esporas del biocontrolador que del patógeno. Esto asegura la germinación preferencial de las esporas de Fo47 por los componentes del exudado de las raíces, lo que reduce el crecimiento del patógeno hacia la raíz porque más hifas de Fo47 pueden competir por los nutrientes del exudado radicular y, por ende, reducir los nutrientes que podría utilizar el patógeno, a pesar de tener una pobre colonización (Bolwerk et al., 2005).

F. oxysporum Fo47 puede ocupar y reducir el número de sitios en que se fijan las esporas del patógeno para infectar y así reduce la colonización del patógeno *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, lo que resulta en un menor número de lesiones sintomáticas que las que presenta el testigo. La mayor concentración de inóculo de Fo47 compensa su crecimiento menos agresivo y, en consecuencia, contribuye a la competencia efectiva de nichos y nutrientes en la raíz del tomate. También es probable que la resistencia inducida desempeñe un papel en el manejo de la pudrición de la raíz y el cuello del tallo. El recubrimiento de semillas, como una estrategia de introducción del agente de control y plántulas con esporas Fo47, resultó en una reducción de la incidencia de la enfermedad del 100 al 75 % (Bolwerk et al., 2005).

De otra parte, la inoculación de tomate con Fo47 se correlacionó con niveles aumentados de PR-1, quitinasa, β-1,3-glucanasa y β-1,4-glucosidasa (Duijff, Pouhair, Olivain, Alabouvette, & Lemanceau, 1998; Fuchs, Moënne-Loccoz, & Défago, 1997), lo que indica que Fo47 actúa a través de un mecanismo

similar a la resistencia sistémica adquirida (SAR). Fo47 no causó síntomas visibles, mientras que la necrosis se asoció con la SAR inducida por patógenos. Por lo tanto, la reducción de la incidencia de la enfermedad pudo ser el resultado de Fo47 en la inducción de resistencia en el tomate.

Control biológico de insectos plaga

La colonización endófita, además de actuar en el control de fitopatógenos, es conocida por su capacidad de mejorar la resistencia contra insectos herbívoros debido a la modulación que ejerce en el sistema de defensa de las plantas que acompaña el proceso de inoculación (Dicke, Van Loon, & Soler, 2009; Pieterse, Poelman, Van Wees, & Dicke, 2013; Poelman et al., 2012). Adicionalmente, induce cambios en la calidad nutricional de las plantas y en la producción de varios compuestos de defensa de la planta, de tipo alcaloide (Thakur, Kaur, Kaur, & Singh, 2013).

Existe una amplia evidencia de la capacidad de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Lecanicillium lecanii* de colonizar tejidos vegetales de algunas especies, lo cual, dependiendo de la especie de planta y de la cepa del hongo, puede determinar si la interacción genera un beneficio para ambos, la planta y el hongo, o si por el contrario la interacción es neutra e incluso antagónica (Vidal & Jaber, 2015). Vidal y Jaber (2015) mencionan que existen algunos efectos adversos sobre los insectos que se alimentan de plantas colonizadas por estos endófitos, sin embargo, los datos son altamente variables e inconsistentes, lo cual no permite determinar los mecanismos que explican tales efectos. Por su parte, Vega (2008) reportó que, de una colecta de hongos endófitos en plantas de café, el hongo entomopatógeno *B. bassiana* y el antagonista de fitopatógenos *Clonostachys rosea*, a pesar de haber sido aislados de tejidos vegetales, fueron capaces de ocasionar patogenicidad en individuos de la broca del café *Hypothenemus hampei*.

Beauveria bassiana ha sido reportado colonizando exitosamente tejidos vegetales como hojas, raíces y tallos de plantas de fríjol *Phaseolus vulgaris* como resultado de una inoculación artificial por medio de aspersión foliar o aplicación en el sustrato con una suspensión de sus esporas (Parsa, Ortiz, & Vega, 2013), al igual que en tallos de plantas de café (Posada, Aime, Peterson, Rehner, & Vega, 2007), en *Papaver somniferum* cv. *nigrum* (Quesada-Moraga et al., 2006a) y también en cultivos *in vitro* de banano *Musa* spp. En estos últimos se presentó un detrimento en la sobrevivencia de larvas de *Cosmopolites sordidus* (Akello, Dubois, Coyne, & Kyamanywa, 2008). De otra parte, la colonización endófita de plántulas de tomate y algodón con *B. bassiana* proporcionó una mayor protección contra los fitopatógenos *Rhizoctonia solani* y *Pythium myriotylum* a mayor concentración aplicada en semilla (Ownley et al., 2008).

Producción de metabolitos secundarios

Una de las principales características de los microorganismos endófitos es la producción de metabolitos secundarios. Algunos de estos compuestos son antibióticos con propiedades antifúngicas, antibacteriales e insecticidas, los cuales pueden inhibir eficazmente el desarrollo de otros microorganismos, incluyendo fitopatógenos (Gunatilaka, 2006). Estas propiedades hacen que la bioprospección de microorganismos endófitos haya tomado fuerza en los últimos años, dado su potencial de manejo dual de insectos plaga y de enfermedades, así como los diferentes mecanismos de acción que permiten obtener plantas con mayor producción de biomasa gracias a la promoción de crecimiento que confieren algunos de estos microorganismos (Strobel & Daisy, 2003).

En los sistemas planta-insecto-hongo endófito, la producción de metabolitos secundarios es importante para mantener la relación simbiótica entre la planta y el hongo debido a la capacidad de los hongos endófitos para alterar el comportamiento de alimentación de los invertebrados, así como la reducción de la tasa de desarrollo de los insectos que protege, a su vez, a la planta hospedera de la herbivoría (Rohlfs & Churchill, 2011).

En el caso de los metabolitos tóxicos producidos por hongos endófitos se encuentran los emitidos por *Epicloë* spp. y *Neotyphodium* spp., los cuales, cuando colonizan pasturas de importancia agronómica, contribuyen en

la reducción de poblaciones de insectos asociados, mejorando así la aptitud ecológica de la planta y reduciendo la del insecto (Clay & Schardl, 2002). Uno de los compuestos producidos por el hongo *Epicloë*, la pernamina, actúa como un disuasivo de insectos, por lo tanto, las plantas inoculadas con este hongo cuentan con una protección frente a la herbivoría. Tanaka, Tapper, Popay, Parker y Scott (2005) encontraron que las plantas inoculadas con una cepa transgénica de *Epicloë festucae* que no podía producir el compuesto pernamina eran tan atractivas ante el gorgojo argentino del raigrás (*Listronotus bonariensis*) como aquellas que no contenían el endófito.

Los hongos entomopatógenos más estudiados son *Metarhizium* spp., *Lecanicillium* spp., *Isaria* spp, *Sporothrix* spp., *Hirsutella* spp., *Aschersonia* spp., *Paecilomyces* spp., *Tolypocladium* spp., *Nomuraea* spp. y *B. bassiana* (Vega et al., 2009), cada uno de los cuales produce una serie de metabolitos secundarios que presentan amplia variedad de actividades biológicas contra mamíferos, insectos, microorganismos y células vegetales (Rohlfs & Churchill, 2011). En estudios realizados sobre la virulencia de *M. anisopliae* en relación con la producción del compuesto serinociclina y el compuesto mutagénico NG-391 se comprobó que ninguno de los dos está involucrado en la virulencia de este hongo contra larvas de *Spodoptera exigua* (Moon et al., 2008). En contraposición, compuestos como la dextruxina, producidos por muchas especies del complejo de *Metarhizium* spp., han demostrado que juegan un papel importante en el incremento de la susceptibilidad de insectos como *Drosophila* spp. a la infección por otros entomopatógenos de origen bacteriano. Sin embargo, es importante tener en cuenta que no todos los metabolitos secundarios emitidos por entomopatógenos actúan como toxinas o factores de virulencia, lo cual aumenta la relevancia de los estudios que permitan elucidar cómo los metabolitos secundarios emitidos por los entomopatógenos contribuyen al proceso de infección, desarrollo y comportamiento de los insectos hospederos (Rohlfs & Churchill, 2011).

Beauveria bassiana es considerado uno de los hongos entomopatógenos más empleados para el manejo de poblaciones de insectos plaga, sin embargo, este mismo hongo presenta diferentes funciones en la naturaleza, por ejemplo, cuando se obtiene logra establecer una colonización constante del endófito en la planta, es antagonista de algunos patógenos de plantas, promotor del crecimiento vegetal y puede colonizar la rizosfera de algunas especies; sin embargo, para alcanzar el potencial biocontrolador del endófito es necesario realizar estudios que permitan conocer sus modos de acción (Jaber & Ownley, 2018).

Estudios recientes han demostrado que aplicaciones foliares con los hongos *B. bassiana* (EABb 04/01-Tip, EABb 01/33-Su, Bb04a) y *Metarhizium brunneum* (EAMb 09/01-Su) sobre plantas de alfalfa, tomate y melón conducen a una colonización endófita transitoria de los tejidos de las plantas tratadas. Este endofitismo causa un incremento en las tasas de mortalidad de las larvas del gusano soldado *Spodoptera littoralis* cuando se alimentan directamente de las plantas tratadas con el endófito, comparado con larvas inoculadas directamente con el hongo entomopatógeno (Resquín-Romero, Garrido-Jurado, Delso, Ríos-Moreno, & Quesada-Moraga, 2016). Al evaluar las mismas cepas de *B. bassiana* y *M. brunneum* y una cepa adicional de este último (EAM 01/58-Su) en hojas de plantas de melón, se observó una mortalidad adicional en ninfas de mosca blanca *Bemisia tabaci*, que varió del 53,4 % en individuos tratados directamente con los entomopatógenos a un 96 % en ninfas alimentadas con plantas inoculadas con los endófitos. En los tratamientos con *M. brunneum* se observó que el 43 % de las ninfas melanizadas presentó dextruxina A, un metabolito secundario que posiblemente es responsable de la mortalidad de los insectos (Garrido-Jurado et al., 2017).

A pesar de los diferentes ejemplos en los que la aplicación de hongos entomopatógenos endófitos ha resultado en el control de poblaciones de insectos plaga, solo en algunos casos se ha reportado que el efecto sobre los insectos se debió a una micosis directa del entomopatógeno (Akello et al., 2008; Garrido-Jurado et al., 2017; Lopez & Sword, 2015; Vidal & Jaber, 2015), y en la mayoría de los casos es atribuible a la acción indirecta de productos emitidos por el endófito que afectan el desarrollo o comportamiento del insecto, lo cual es sustentado por la ausencia de esporulación del hongo en los insectos recuperados después de consumir tejido vegetal colonizado por hongos entomopatógenos endófitos (Jaber & Ownley, 2018).

Efectos adversos de algunos endófitos

La producción de metabolitos secundarios por los hongos endófitos no solamente es conocida por su efecto en la protección de las plantas frente a ataques de herbívoros, sino también por los efectos negativos que puede tener la emisión de ciertos alcaloides, lo cual ha sido asociado al aumento del número de herbívoros y a su riqueza en especies, y sugiere que las grandes cantidades de alcaloides medidas en especies de pastos nativos podrían afectar negativamente la acción de los enemigos naturales de los invertebrados y no conferir ninguna protección a la planta (Jani, Faeth, & Gardner, 2010).

En cuanto a la emisión de voc, está documentado que las plantas se comunican con su entorno por medio de la emisión de este tipo de semioquímicos, los cuales, a su vez, son reconocidos por diferentes organismos asociados con las plantas, como los insectos herbívoros y sus enemigos naturales (figura 19.2). Se ha demostrado que esta comunicación multitrófica puede ser interrumpida o cambiada cuando la planta se encuentra colonizada por uno o más microorganismos endófitos (Battaglia et al., 2013; Jaber & Vidal, 2009; Jallow, Dugassa-Gobena, & Vidal, 2008; Rodriguez-Saona, Blaauw, & Isaacs, 2012; Zhang, 2014) y que estas variaciones, a su vez, pueden modular la interacción de las plantas con algunos insectos plaga y sus enemigos naturales; esta interacción depende directamente de la cepa evaluada (Aragón, 2016).

Por ejemplo, Battaglia et al. (2013) estudiaron el modelo de interacción multitrófica entre la planta de tomate *Solanum lycopersicum* var. San Marzano Nano, el hongo biocontrolador *Trichoderma longibrachiatum*

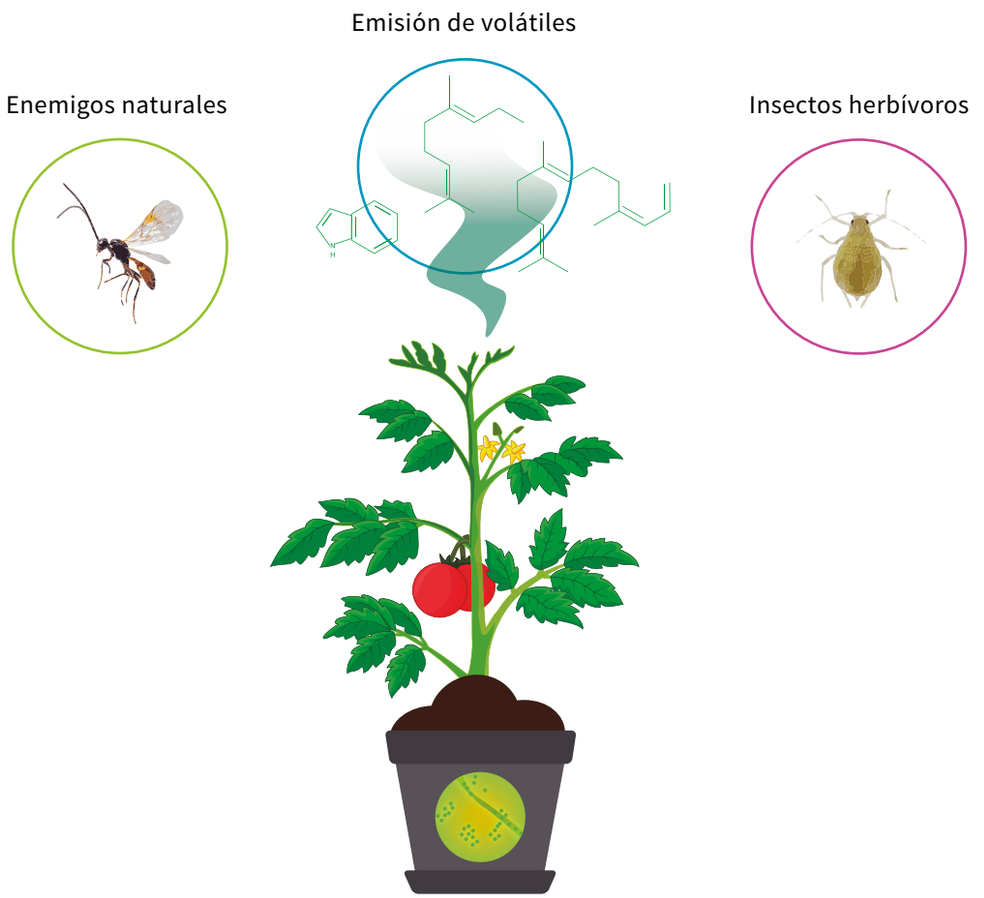


Figura 19.2. La emisión de compuestos orgánicos volátiles (voc) de una planta puede ser modificada por la colonización con hongos endófitos que producen cambios en la comunicación química entre la planta y los demás organismos que interactúan con ella, como los insectos herbívoros.

Fuente: Elaboración propia

cepa MK1, el áfido *Macrosiphum euphorbiae* y sus enemigos naturales, el parasitoide *Aphidius ervi* y el depredador *Macrolophus pygmaeus*. Evaluaron los efectos de la colonización con el hongo endófito sobre la emisión de compuestos orgánicos volátiles de la planta de tomate y sus potenciales efectos sobre el desarrollo y la reproducción del áfido *M. euphorbiae* y sus enemigos naturales, y encontraron que, en comparación con las plantas testigo, aquellas plantas colonizadas por *T. longibrachiatum* permitieron mayores índices de crecimiento de poblaciones del áfido, mayor atracción de los dos enemigos naturales y un desarrollo más rápido del depredador de áfidos.

Aragón (2016) observó que inoculaciones con el hongo endófito *B. bassiana* afectan la composición de compuestos volátiles emitidos por la planta de tomate bajo condiciones de invernadero y reducen la cantidad emitida de m-cimeno, un compuesto emitido constitutivamente por la planta que le permite repeler insectos como los áfidos. Al evaluar diferentes cepas de *B. bassiana*, observó que la variación en la composición de volátiles es especie-específica, de igual forma que la respuesta de atracción de áfidos de la especie *Myzus persicae*, los cuales presentaron mayor atracción hacia plantas de inoculadas con *Beauveria bassiana* EABb 04/01-Tip que hacia las plantas no inoculadas. Así mismo, cuando la colonización endófita se realizó con *Trichoderma koningiopsis*, un hongo benéfico conocido por su capacidad de controlar el marchitamiento vascular causado por *F. oxysporum* (Jaimes, Moreno, & Cotes, 2009), se observó que la atracción de áfidos de la misma especie *M. persicae* fue mayor que hacia las plantas testigo (Aragón, 2016).

Adicionalmente, estudios acerca del comportamiento de oviposición de las hembras de la especie *Helicoverpa armigera* frente a plantas inoculadas con *B. bassiana*, *M. brunneum* o *T. koningiopsis* demostraron que este insecto es capaz de reconocer diferencialmente las plantas de acuerdo con la composición de sus volátiles, y presenta una clara preferencia de oviposición en plantas tratadas con *B. bassiana* EABb 04/01-Tip, de manera similar a lo que sucede con los áfidos (figura 19.3) (Aragón, 2016).

Un caso contrario se presentó en los resultados obtenidos por Jallow et al. (2008), quienes observaron que plantas de tomate inoculadas con el hongo endófito

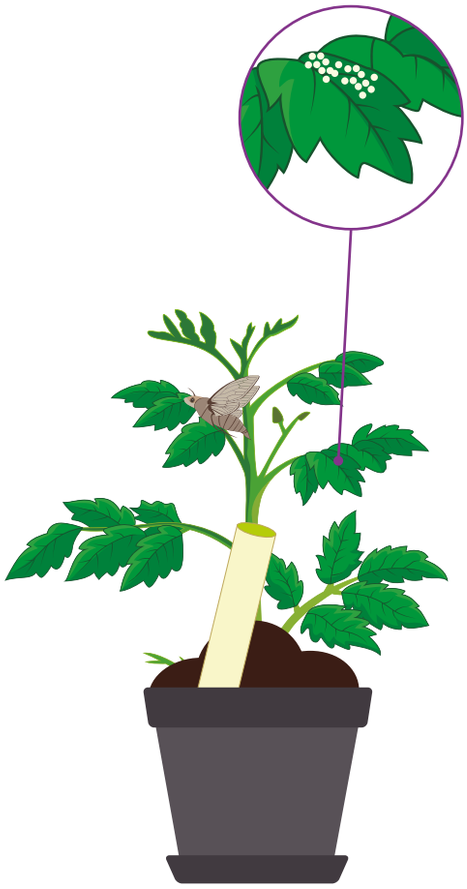


Figura 19.3. Plantas de tomate *Solanum lycopersicum* inoculadas con el endófito *Beauveria bassiana* EABb 04/01-Tip que modificaron la composición de los compuestos orgánicos volátiles emitidos, lo cual aumentó directamente el comportamiento de oviposición de *Helicoverpa armigera* en comparación con plantas no inoculadas o inoculadas con otros endófitos.

Fuente: Elaboración propia

Acremonium strictum redujeron significativamente la producción del mismo compuesto, m-cimeno, pero al evaluar el comportamiento de oviposición de *H. armigera* observaron que las plantas inoculadas con el endófito presentaron un menor número de oviposiciones que aquellas no tratadas con el hongo, lo cual confirma la especificidad de la relación planta-endófito y las consecuencias sobre la interacción con insectos.

El reconocimiento de las señales emitidas por las plantas depende de la estrategia de alimentación del insecto evaluado, pues en algunos casos el reconocimiento de

estos semioquímicos se realiza a corta distancia para insectos chupadores con distancias de distribución cortas, mientras que insectos voladores, con distancias largas de distribución, son capaces de reconocer las señales desde largas distancias (Szendrei & Rodriguez-Saona, 2010).

Efecto dual de los hongos endófitos

Uno de los primeros reportes acerca de protección de plantas otorgada por algunos microorganismos endófitos fue el de Webber (1981), que abordó el caso del hongo *Phomopsis oblonga* y su control sobre poblaciones del insecto plaga *Physocnemum brevilinenu*. La interacción entre el hongo endófito *P. oblonga* y árboles de olmo holandés contribuyó indirectamente a la disminución en la dispersión del hongo patógeno *Ceratocystis ulmi*, agente causal de la enfermedad, debido al manejo de las poblaciones de su insecto vector, *P. brevilinenu*, lo cual se relacionó con alcaloides y micotoxinas emitidas por el endófito (Dutta, Puzari, Gogoi, & Dutta, 2014).

El control biológico dual de insectos y fitopatógenos ha sido reportado para los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *Lecanicillium* spp. El endófito *B. bassiana* produce una serie de metabolitos bioactivos que limitan el crecimiento de algunos hongos fitopatógenos en condiciones *in vitro*, mientras que, en experimentos *in planta*, *B. bassiana* reduce la enfermedad causada por los patógenos del suelo *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp. y *Fusarium* spp. En el caso de *Lecanicillium* spp. se ha reportado que es inductor de resistencia sistémica contra el mildeo polvoso, sin embargo, se conoce que este hongo también actúa por micoparasitismo en el control de dicha enfermedad (Ownley et al., 2010).

Patrones de colonización

Los microorganismos endófitos pueden presentar diferentes preferencias de colonización en los tejidos de la planta hospedera; así mismo, la movilidad de los endófitos a lo largo de la planta ha sido ampliamente documentada. Es el caso de *B. bassiana*, que en condiciones de campo ha sido aislado de diferentes órganos de las plantas, tales como raíces, hojas, tallos e incluso del hipocótilo (Aragón, 2016; Zhang, 2014), mientras que *Metarhizium* sp. se ha observado casi exclusivamente en las raíces (Aragón, 2016; Behie, Jones, & Bidochka, 2015; Vidal & Jaber, 2015; Zhang, 2014). *B. bassiana* ha sido principalmente asociado con insectos o hábitats de insectos, incluyendo suelos. Sin embargo, también ha sido descrito como simbionte de plantas, capaz de colonizar un amplio rango de monocotiledóneas y dicotiledóneas, como café, banano, maíz y trigo, lo cual da cuenta de su baja especificidad (Ownley et al., 2008; Vega, 2008). Aunque poco se ha reportado respecto al mecanismo por el cual este microorganismo se distribuye a lo largo de la planta, se sugiere que *B. bassiana* es capaz de colonizar de manera sistémica su planta hospedera, y a pesar de que su estilo de vida endófito es facultativo, dado que no siempre se desarrolla en el interior de los tejidos de su planta hospedera, sí es conocido por formar asociaciones de largo plazo que sugieren un alto grado de mutualismo (Biswas, Dey, Satpathy, & Satya, 2012; Ownley et al., 2008).

Los microorganismos endófitos, como cualquier otro organismo, tienen requerimientos nutricionales, por lo cual su infección genera algún costo a la planta hospedera. Este es probablemente balanceado por algunas capacidades del hongo que contribuyen con funciones ecológicas o fisiológicas específicas que resultan en un beneficio para el hospedero bajo condiciones ambientales particulares, como la interacción con organismos de otros niveles tróficos (Michaud, Pell, & Vega, 2017).

El efecto de las interacciones entre hongos endófitos e insectos herbívoros ha sido reportado principalmente para pastos usados en agricultura, los cuales, en principio, se encontraban colonizados por hongos endófitos clavicipitáceos (Ascomicota: Hypocreales: Clavicipitaceae), que son capaces de colonizar de manera sistémica la mayoría de pastos de las familias Poaceae, Juncaceae y Cyperaceae. Los pastos inoculados han demostrado una alta resistencia al consumo foliar por insectos debido a su contenido de alcaloides

biológicamente activos, los cuales pueden alterar el ciclo de vida de algunos insectos que consumen este tipo de material vegetal (Anjitha, 2017). Los ejemplos más comunes citados en la literatura son los de las especies *Lolium perenne* y *Festuca arundinacea* infectadas con el hongo endófito *Neotyphodium*, que causa un efecto negativo en más de 40 especies de insectos distribuidos en seis órdenes (Azevedo, Maccheroni Jr, Pereira, & De Araújo, 2000).

El cultivo de cacao se ve afectado por diferentes e importantes enfermedades que atacan sus partes vegetativas, sus frutos o ambos (Ten Hoopen, Deberdt, Mbenoun, & Cilas, 2012). Una de las enfermedades más importantes es la moniliasis causada por *Moniliophthora roreri*, que puede llegar a producir pérdidas del 40 % de la producción del fruto (Jaimes & Aranzazu Hernández, 2010). Varios factores pueden estar involucrados en la susceptibilidad a la enfermedad, como el ciclo de fructificación, el tamaño de la fruta, la edad, la posición en el árbol y el genotipo del cacao, por lo que su control químico no es muy efectivo debido al rápido desarrollo y el crecimiento longitudinal del fruto (promedio de 3 mm diarios) (Ten Hoopen et al., 2012); además, puede contaminar aguas y suelos.

En consecuencia, se han explorado y evaluado hongos endófitos para el control de algunas enfermedades del cacao, los cuales, aunque no producen efectos visibles en su hospedero, han demostrado actividad, ya que tienen diferentes mecanismos que ayudan a proteger a su hospedero, como el parasitismo, la antibiosis y la competencia por sustrato; pueden tener efectos genéticos y fenotípicos que resulten en un incremento de la resistencia a los patógenos (Herre et al., 2007; Mejía et al., 2014), y que además conserven la estabilidad y la biodiversidad del suelo en el ecosistema particular del cultivo al reducir el uso de agroquímicos (Crowder & Harwood, 2014).

Hace relativamente poco tiempo que se ha reconocido el papel esencial que algunos de estos simbiontes microbianos pueden desempeñar en la ecología de su huésped, y su éxito evolutivo ha llevado a la investigación sobre la exploración de esta relación para el control de diferentes enfermedades (Backman & Sikora, 2008; Mejía et al., 2014).

Endófitos aislados de las hojas de cacao, como *Colletotrichum tropicale* (muy común y dominante como endófito foliar), pueden inducir cambios consistentes en la expresión de cientos de genes del huésped, algunos de ellos con funciones de inducción de defensas (Mejía et al., 2014). También la colonización por diferentes endófitos como *Colletotrichum* sp., *Fusarium/Nectria* spp. y *Xylaria* sp., aislados de hojas de *T. cacao*, y de especies como *Ouratea lucens* y *Heisteria concinna*, puede reducir la necrosis y la mortalidad de hojas de *T. cacao* al ser infectados naturalmente con *Phytophthora* sp., mediante la interacción directa de los endófitos con el patógeno foliar e indirectamente por la química de la hoja (Arnold et al., 2003).

En la evaluación *in vitro* de 15 aislamientos de *Trichoderma* representados en siete especies endófitas aisladas del tallo y de fruto de *T. cacao* y de ocho especies aisladas de *Theobroma bicolor, T. speciosum, T. grandiflorum, T. gileri* y *Theobroma* sp., se observaron diferentes niveles de control, como su capacidad para inhibir y parasitar *M. roreri*. Los aislamientos de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma asperellum* endófitos de tallo y los aislamientos de *T. harzianum* y *Trichoderma hamatum* aislados de frutos son los más destacados en su capacidad de colonización y control del patógeno, mientras que los aislamientos de *Trichoderma spirale* y *Trichoderma stromaticum* fueron poco eficientes en la colonización del patógeno (Bailey et al., 2008) (figura 19.4).

Técnicas tradicionales de reaislamiento de hongos endófitos

La observación de microorganismos endófitos se realiza por medio de dos técnicas básicas: observación directa y métodos dependientes de cultivo. En la observación directa, las estructuras de los microorganismos que crecen dentro del tejido vegetal son examinadas directamente bajo microscopía de luz o electrónica. Esta técnica permite observar la microbiota que no es posible cultivar en medios de cultivo estándar. Sin embargo, la mayoría de hongos endófitos, cuando se desarrollan dentro del tejido vegetal, solo presentan hifas, lo que dificulta su identificación taxonómica debido a la falta de estructuras de reproducción sexuales o asexuales (conidios y esporas) (Sun & Guo, 2012).

Las técnicas dependientes de cultivo han sido usadas tradicionalmente para el reaislamiento de microorganismos endófitos en diferentes plantas (Parsa et al., 2013; Posada et al., 2007; Quesada-Moraga, Landa, Muñoz-Ledesma, Jiménez-Díaz, & Santiago-Álvarez, 2006a). Con esta técnica, el material vegetal debe pasar por diferentes procesos de esterilización superficial para remover todos los organismos que se encuentran en la superficie del tejido y garantizar que se aíslen los microorganismos que se están desarrollando en el interior de los tejidos (Sun & Guo, 2012).

El proceso, que depende de un subcultivo en medio nutritivo, generalmente incluye los siguientes pasos: 1) lavado del material vegetal con agua corriente para remover la mayoría de partículas que se encuentran en la superficie del tejido, por ejemplo, residuos de suelo y microorganismos epífitos, entre otros; 2) una esterilización superficial para eliminar microorganismos que aún queden en la superficie del tejido; los protocolos de esterilización superficial pueden variar dependiendo del tipo de tejido; 3) aislamiento del hongo endófito proveniente del material, que se desarrolla en el medio de cultivo nutritivo; 4) purificación y crecimiento hasta esporulación de los aislamientos endófitos bajo diferentes condiciones de incubación y 5) identificación del hongo endófito basada en características morfológicas en el medio de cultivo (Quesada-Moraga, Ruiz-García, & Santiago-Alvarez, 2006b; Sun & Guo, 2012; Wang & Guo, 2007).

Técnicas moleculares para la detección de endófitos *in planta*

Debido a las limitantes de las técnicas tradicionales de aislamiento de hongos endófitos, es muy probable que muchos de los microorganismos endófitos no puedan ser aislados, ya que en algunos casos se trata de microorganismos no cultivables o su desarrollo

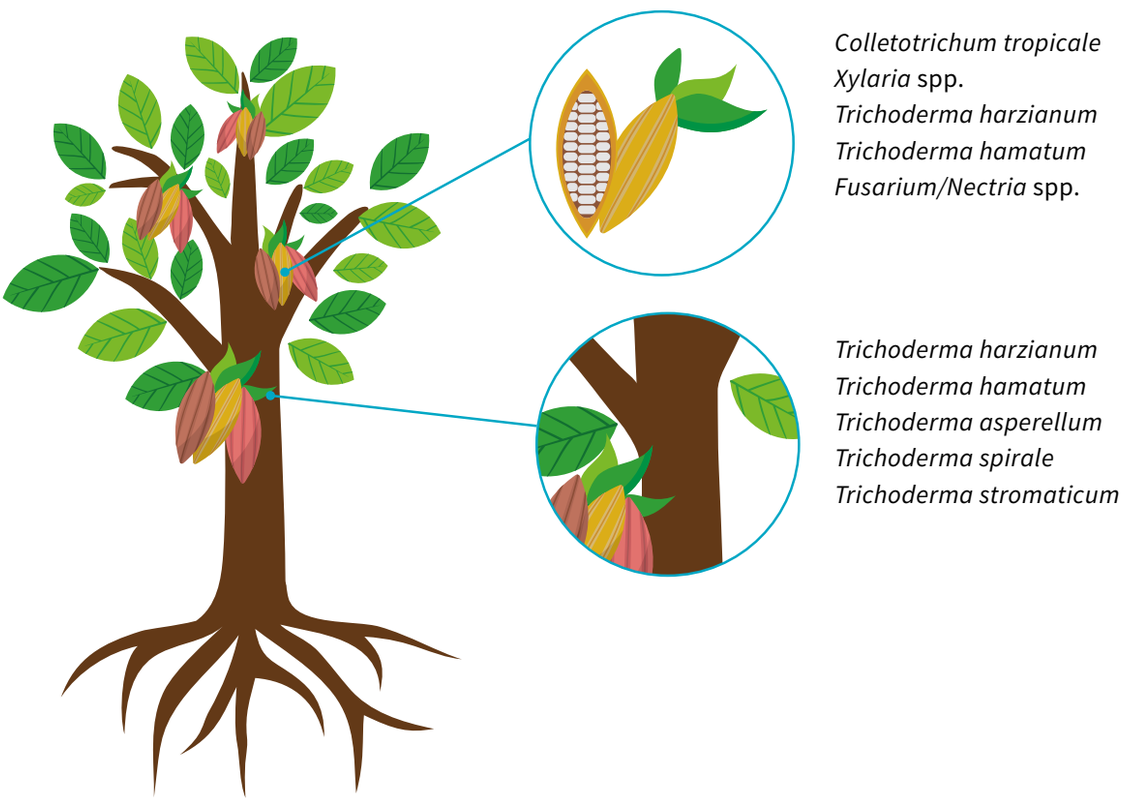


Figura 19.4. Microorganismos endófitos aislados de diferentes órganos de la planta de cacao.

Fuente: Elaboración propia

en medio nutritivo es muy lento y son superados por otros microorganismos con tasas de desarrollo más rápidas (Sun & Guo, 2012).

Las técnicas moleculares permiten detectar cantidades de hongos endófitos que difícilmente pueden ser encontradas con los métodos tradicionales de aislamiento. Generalmente un proceso de estudio molecular incluye: 1) extracción del ADN genómico, incluyendo el de la planta y el hongo; 2) amplificación de los fragmentos de ADN usando primers específicos del hongo; 3) separación de los productos por PCR, por medio de electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante y la escisión de diferentes bandas del gel que representan diferentes *taxa*; (4) clonación de los productos directamente en plásmidos y transferencia a *E. coli* DH5α; 5) búsqueda de clones positivos para los diferentes *taxa* usando técnicas de *fingerprinting* como PCR-RFLP; 6) secuenciación de los clones representativos y 7) identificación basada en análisis filogenético (Sun & Guo, 2012). Si el propósito del estudio es cuantificar el ADN de un hongo endófito conocido, entonces bastará con realizar un PCR cuantitativo usando primers específicos.

Los protocolos, en este caso, varían de acuerdo con el microorganismo que se desea cuantificar (Landa et al., 2013).

Casos exitosos

El desarrollo de productos a base de microorganismos endófitos es una estrategia relativamente reciente, sin embargo, países como Nueva Zelanda se encuentran entre los mayores productores de material vegetal inoculado con microorganismos endófitos, los cuales son integrados en las semillas de coberturas vegetales usadas principalmente para campos deportivos. Estos pastos que contienen hongos endófitos favorecen la liberación de algunos alcaloides que previenen el ataque de herbívoros vertebrados e invertebrados. Así mismo, existen productos de pasturas que contienen endófitos y un bajo contenido de alcaloides, lo cual permite su uso en el pastoreo de especies productoras de leche o carne.

En la tabla 19.1 se muestran algunos factores que, de acuerdo con Card et al. (2016), se deben tener en cuenta para obtener un producto exitoso comercialmente.

Tabla 19.1. Factores que se deben tener en cuenta para que un microorganismo endófito sea comercialmente exitoso

Característica	Descripción
Modo de aplicación	El agente de control biológico debe ser de fácil aplicación, de tal manera que no se requieran equipos especializados para su diseminación en los cultivos. Adicionalmente, debe ser especie-específico para evitar una transmisión a los cultivos aledaños y potenciales consecuencias de incompatibilidad en las nuevas interacciones biológicas que se puedan generar.
Modo de acción	El microorganismo debe tener uno o más mecanismos de acción efectivos, por ejemplo, compuestos bioactivos que puedan ser movilizados hacia el lugar donde se requiere de su efecto. Sin embargo, se debe propender por una bioactividad especie-específica que no presente efectos antagónicos sobre especies benéficas no blanco, como abejas polinizadoras, avispas parasitoides o insectos depredadores.
Protección del material genético	El producto comercialmente disponible debe estar protegido, de tal forma que las cepas individuales puedan ser identificadas y comercializadas sin que sea posible su propagación a partir del material comercial.
Costo biológico	En ninguna circunstancia, el producto a base de microorganismos endófitos debe causar síntomas o crear un costo biológico significativo en su planta hospedera.

Fuente: Adaptado de Card et al. (2016)

Productos comerciales a base de hongos endófitos

Como ejemplo, se describen tres hongos filamentosos con características de endófitos, dos de estos microorganismos con actividad bioinsecticida y uno con blanco en un hongo fitopatógeno; estos ingredientes activos cumplieron un sinnúmero de pasos de evaluación e investigación para llegar a ser un producto aplicable con uso en agricultura. El desarrollo de un bioproducto generalmente incluye el hallazgo del microorganismo, el descubrimiento de sus propiedades, su multiplicación y producción en diferentes escalas, el desarrollo del producto, cumplir diferentes pruebas de eficacia, realizar su registro y finalmente la comercialización (Ravensberg, 2015).

Bipesco *Metarhizium brunneum*

M. brunneum Petch (sin. *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*) cepas 5 y F52 son subcultivos de la cepa individual M.a. 43, y constituyen el ingrediente activo de los productos a base de Bipesco 5/F52, formulados como polvo mojable (WP), originalmente aislado de la carpocapsa o polilla de la manzana (*Cydia pomonella*, lepidoptera: Tortricidae) en Austria en 1967 (Ríos-Moreno et al., 2016b; Singh, Gill, & Tuteja, 2011). Este bioplaguicida tiene una amplia gama de hospederos naturales o "agrícolas" que se encuentran en y sobre el suelo, como áfidos, trips, mosca blanca, escarabajos (Coleoptera: Melolonthidae), gorgojos (Coleoptera: Curculionidae), ácaros y mosquitos (European Food Safety Authority [EFSA], 2012).

El biocontrolador causa la muerte del insecto debido a varios procesos, incluyendo el agotamiento de nutrientes, la obstrucción física, la parálisis o la invasión de órganos y toxicosis (EFSA, 2012). Además, produce al menos 15 toxinas destruxinas (A, B, C, D, E, Ed, Ed1, A2, B2, D2, E2, CL, DesmA, DesmB, DH-A). La destruxina A es el metabolito más abundante (Ríos-Moreno et al., 2016a; Ríos-Moreno et al., 2016b) y uno de los principales metabolitos secundarios producidos por el género *Metarhizium*, importante para la actividad insecticida y el desempeño de roles claves en la patogénesis (Hu & Leger, 2002).

Los conidios de Bipesco 5 y F52 germinan en la superficie del hospedero, pueden diferenciarse al formar apresorios e invaden por penetración directa del exoesqueleto o la cutícula. Una hifa infectiva penetra a través de la cutícula del hospedero y eventualmente emerge en el hemocele, donde el hongo produce células flotantes que son pasivamente transportadas y las toxinas pueden ser producidas. Después de la muerte del insecto, bajo condiciones húmedas, el micelio penetra en la cutícula del insecto y produce conidios infecciosos en el exterior del cadáver (EFSA, 2012). Bajo condiciones secas, el hongo puede sobrevivir en la fase micelial, pero no produce conidios en el exterior del cuerpo. La producción de conidios requiere temperaturas óptimas para la esporulación de 25-30 °C. *M. brunneum* puede crecer *in vitro* en el rango de pH de 3,3-8,5, pero por debajo de 10 °C y por encima de 35 °C no esporula (EFSA, 2012).

Adultos de las especies *Strophosoma melanogrammum* y *Strophosoma capitatum* tratados con una suspensión de conidios no formulados de Bipesco a 1×10^7 conidios. mL^{-1}, bajo condiciones de laboratorio (20 °C con fotoperiodo de 16:8 h luz: oscuridad), presentaron una patogenicidad del 100 % a los 21 días, con un tiempo medio de supervivencia (TMS) de 13,5 días para *S. melanogrammum* y de 96,5 % a los 32 días, y un TMS de 22,6 días con *S. capitatum*, demostrando así su capacidad de infectar y causar micosis (Nielsen, Vestergaard, Harding, Wolsted, & Eilenberg, 2006).

En condiciones de campo se realizaron dos aplicaciones de conidios no formulados de Bipesco, con un intervalo de 15 días, al suelo de un cultivo de pino o abeto rojo (*Abies procera*) de ocho años de edad con antecedentes de daño por *Strophosoma* spp., a una concentración de 1×10^7 (200 $mL \times m^2$ = aprox. 1×10^{14} conidios. ha^{-1}). Cada individuo adulto capturado semanalmente durante tres años de evaluación y en los períodos de mayor actividad (primavera [abril-junio] y otoño [agosto-octubre]) fue evaluado en laboratorio durante cuatro semanas (20 °C, 16:8 h luz: oscuridad) para registrar la mortalidad. Se alcanzó una prevalencia del hongo del 90 % y del 78 % en adultos de *S. melanogrammum* y *S. capitatum* respectivamente en los

dos primeros meses después de aplicación (primavera del primer año). En las parcelas del tratamiento testigo, la prevalencia de otros hongos entomopatógenos (*M. anisopliae*, *B. bassiana*, *P. farinosus* y *Lecanicillium*) fue menor al 8 % en *S. melanogrammum* y nula en *S. capitatum*. Para el otoño del mismo periodo evaluado, la reducción en *S. melanogrammum* fue de 52 % y 54 % para *S. capitatum* en parcelas tratadas en comparación con las parcelas testigo (Nielsen et al., 2006).

En el otoño del segundo año de evaluación, la densidad de *S. melanogrammum* y *S. capitatum* fue significativamente menor en las parcelas tratadas *vs*. las parcelas testigo, que presentaron una reducción en *S. melanogrammum* del 20 % y en *S. capitatum* del 33 %. En el año tres no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en primavera, pero en otoño la población tanto de *S. melanogrammum* como de *S. capitatum* fue significativamente menor en las parcelas tratadas comparadas con las parcelas testigo (Nielsen et al., 2006).

El estudio demostró que la aplicación del principio activo de Bipesco desempeña un papel principal en la supresión de la población de *Strophosoma* spp. y que puede presentar un efecto acumulativo y prevenir un aumento de la población en la siguiente generación, actuando sobre la mortalidad de hembras en periodo de oviposición o generando efectos subletales que causan disminución en la fecundidad y la eclosión de huevos, además de la infección de larvas neonatas (Nielsen et al., 2006).

En otro estudio, Bipesco 5 fue recuperado como endófito de las hojas, los tallos, los tubérculos y las raíces de plantas de papa previamente inoculadas con una suspensión de 10^8 conidios.mL^{-1} y evaluadas posteriormente a las 24, 48, 72, 96 y 120 h. Se observó una colonización diferenciada en los porcentajes y tiempos de colonización, donde el porcentaje de colonización de las hojas fue ligeramente superior al de los tallos y en estos, a su vez, fue significativamente mayor que el porcentaje de colonización en los tubérculos y las raíces. La colonización en las hojas por Bipesco 5 a las 24 h fue del 76,6 %, presentó la colonización máxima a las 96 h con un 81,6 % y se observó una tendencia a la disminución de la colonización al final del ensayo. A las 24 h, los tallos tuvieron una colonización de 65 %, y su valor máximo fue de 73,3 % a las 72 y 96 h. Se observó colonización en el tubérculo y en las raíces, aunque el aumento en el porcentaje de colonización no fue muy alto: a las 72 h fue del 11,6 % en tubérculos y 13,3 % en raíces, lo cual refleja ligeramente más colonización de la raíz comparada con el tubérculo (Ríos-Moreno et al., 2016b).

Esta investigación confirmó que las concentraciones de destruxina A difieren en el tubérculo a las 24 h y en la raíz a las 48 h (6,8 ± 4,8 y 2,1 ± 1,4 µg / kg, respectivamente) y no se observó en hojas y tallos. Su concentración en los tejidos vegetales fue muy baja en comparación con los niveles de colonización, lo que sugiere que la producción de destruxina A por el hongo puede ser temporal y que el compuesto podría degradarse rápidamente (Ríos-Moreno et al., 2016b).

El éxito de los tratamientos con entomopatógenos radica en comprender con precisión cuándo es el momento adecuado de realizar cada aplicación y conocer la persistencia del principio activo bajo ciertas condiciones ambientales, además de tener claro el ciclo de vida (p. ej., el ciclo de vida de dos años de los picudos) y la etología de la plaga (Nielsen et al., 2006).

Naturalis-L *Beauveria bassiana*

El ingrediente activo del bioinsecticida Naturalis-L es la cepa ATCC 74040 de *B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycetes, Moniliales) formulada en aceite. Esta fue originalmente aislada del gorgojo del algodón *Anthonomus grandis* (Boheman) (Coleoptera: Curculionidae) en el valle del Bajo Río Grande, Texas, EE. UU. (Mayoral, Benuzzi, & Ladurner, 2006). El bioplaguicida se recomienda para el control de etapas larvarias y adultas de especies de mosca blanca (Hemiptera) que pertenecen a la familia Aleyrodidae, incluidas las moscas blancas de invernadero *Trialeurodes vaporariorum* y *Bemisia* spp., plagas agrícolas con una alta tasa de reproducción, muy importantes en cultivos bajo invernadero y en campo, con una amplia gama de hospederos, incluyendo malezas, y que además actúan como vectores de varios virus importantes de plantas (Martin, Mifsud, & Rapisarda, 2000; EFSA, 2013). El biocontrolador también actúa sobre estadios larvales y adultos de trips, como *Frankliniella occidentalis* (Jacobson, Chandler, Fenlon, & Russell, 2001).

El excesivo uso de moléculas químicas en ambientes semicontrolados o de invernadero ha aumentado los casos de resistencia de las moscas blancas y disminuido sus agentes naturales de control (Mayoral et al., 2006). Con el propósito de buscar métodos alternativos y eficaces de manejo de la mosca blanca, se evaluó la eficacia del bioinsecticida aplicado en diferentes dosis, en ensayos bajo condiciones de invernadero, sobre cultivos de tomate *Solanum lycopersicum* cv. Naomi y berenjena *Solanum melongena* cv. Cristal. En tomate, todos los tratamientos con Naturalis-L, independientemente de la dosis (de 125, 250 y 300 mL/L) y aplicados semanalmente durante la etapa de maduración del fruto (siete semanas), redujeron significativamente la infestación de mosca blanca mediante la reducción de ninfas vivas, con una eficacia entre el 72 % y el 82,8 % en comparación con el testigo no tratado. Para el tratamiento con el insecticida químico neonicotinoide se presentó el mayor número de ninfas muertas, considerando que la resistencia a este compuesto no se presentó en la población blanco de la mosca blanca (Mayoral et al., 2006).

En berenjena, todos los tratamientos con el bioinsecticida (aplicados dos veces, cada 14 días desde el inicio de la floración) redujeron significativamente la infestación de adultos de mosca blanca en comparación con el testigo no tratado: al aplicar 200 mL/L se observó un efecto dosis-respuesta inferior al del insecticida químico neonicotinoide evaluado (igual forma de aplicación a 75 mL/L), pero usando la misma dosis en mezcla con un coadyuvante o usándolo de manera individual a 300 mL/L su eficacia fue similar al compararlo con el testigo químico.

Esto demuestra que las aplicaciones del producto Naturalis a base de *B. bassiana* son una herramienta altamente eficaz para el control de infestaciones naturales de mosca blanca en cultivos bajo cubierta y que su eficacia podría ser mejorada si es usado en conjunto con un coadyuvante que sea compatible con el endófito o que mejore su adherencia al tejido vegetal y su estabilidad en condiciones de campo. Adicionalmente, al ser incluido en estrategias de manejo integrado de moscas blancas puede ayudar a desarrollar estrategias efectivas de manejo de la resistencia a la plaga y evitar la presencia de niveles inadecuados de residuos de agroquímicos, lo cual contribuye a la inocuidad del producto final (Mayoral et al., 2006).

Vidal y Jaber (2015) evaluaron el potencial del Naturalis-L para crecer y colonizar endófitamente plantas de canola (*Brassica napus* var. Favorite) y de haba (*Vicia faba* cv. Hangdown Grünkernig) aplicando 4 mL de una suspensión de 1×10^8 conidios.mL^{-1} en el haz y el envés de dos hojas opuestas de canola y en el tercer par de hojas verdaderas de haba. Siete días después de la inoculación, confirmaron la colonización endofítica al reaislar el hongo de 12 discos (2 mm^2) estériles de tejido de hojas preinoculadas sembradas en medio de un cultivo selectivo para *B. bassiana* (incubación de 14 días a 25 °C). El porcentaje de colonización se calculó según el número de segmentos colonizados evaluados y dio como resultado que la colonización de plantas de *B. napus* por Naturalis® (83,6 %) fue mayor que en plantas de haba (68,1 %), lo que demostró una alta variabilidad del efecto en diferentes especies de plantas, tanto en la eficacia de colonización como en los posibles efectos adversos sobre insectos herbívoros (Vidal & Jaber, 2015).

En otro ensayo, se evaluó la virulencia del Naturalis-L en plantas de habichuela preinoculadas de manera endofítica sobre larvas de tercer estadio del gusano cogollero (*H. armigera*). Las plantas fueron tratadas como se describió, y siete días después de la inoculación una jaula de sujeción que contenía una sola larva fue unida a una hoja no inoculada de cada planta para asegurar que cualquier efecto contra las larvas introducidas fuera consecuencia de crecimiento de hongos dentro de los tejidos de las plantas. Las larvas se evaluaron diariamente registrando la mortalidad (dispuestas en cámara húmeda durante 14 días) o la formación de pupa. Se obtuvo como resultado una mortalidad larvaria del 25 %, una micosis del 22 % y un tiempo de supervivencia de 21,1 días, comparado con todas las larvas de *H. armigera* alimentadas con plantas del tratamiento control que permanecieron vivas hasta la formación de la pupa. Esto confirma la colonización endofítica por Naturalis-L y el efecto de la interacción endófito-planta-herbívoro, pero se requiere comprender qué produce el efecto de la interacción planta-hongo sobre los insectos herbívoros. La forma de inoculación, las condiciones ambientales y climáticas y el estado nutricional de las plantas pueden desempeñar un papel crucial en la interacción y en el establecimiento. También las plantas hospederas pueden aumentar su metabolismo de defensa al percibir los organismos endofíticos como intrusos hostiles (Vidal & Jaber, 2015).

Tricovab *Trichoderma stromaticum*

La escoba de bruja del cacao (*Moniliophthora perniciosa*) es una enfermedad importante en Suramérica, Centroamérica y el Caribe, ya que ocasiona bajos rendimientos en la producción y alteraciones en el balance hormonal del hospedero, como hipertrofia e hiperplasia y posterior necrosis en el tejido (Wheeler, 1985, citado por De Souza et al., 2006). Después de su llegada en 1989 al estado de Bahía, Brasil pasó de ser el tercer productor mundial de cacao (entre 1988 y 1990) a ser un importador neto en pocos años (1998-2000), demostrando así la severidad del patógeno (Meinhardt et al., 2008). Las basidiosporas del hongo infectan los tejidos meristemáticos y ocasionan diferentes tipos de síntomas, dependiendo del órgano infectado (brotes, botones florales, flores y frutos en desarrollo): en los meristemos apicales, el síntoma es el crecimiento hipertrófico (proliferación vegetativa); en los botones florales induce filodia y formación de frutos partenocárpicos, y cuando la infección ocurre en frutos, las semillas se pudren. La producción de basidiocarpos en la fase saprofítica del hongo y la formación de esporas ocurre a partir del tejido necrótico (Silva et al., 2002, citado por De Souza et al., 2008).

Un solo método de control de la enfermedad es ineficiente, por lo tanto, entre las prácticas de manejo integrado para la escoba de bruja se encuentran el uso de fungicidas de cobre, la eliminación de tejidos enfermos, conocida como *poda fitosanitaria*, que se deben realizar en época seca, y el control biológico (De Souza et al., 2006). Por el momento, el único producto biocontrolador de la escoba de bruja es Tricovab, cuyo ingrediente activo es la cepa AM7 de *T. stromaticum* (De Souza et al., 2006). Esta cepa fue aislada de basidiocarpos de escoba de bruja que afectan plantas de cacao en Belén (Brasil) y es usada en el estado de Bahía (Brasil) de manera masiva (Ten Hoopen & Krauss, 2016).

T. stromaticum solo se encuentra en América Latina y en estrecha asociación como endófito del cacao y de especies relacionadas, como copoazú (*T. grandiflorum*) y *Herrania* spp., lo que sugiere que probablemente coevolucionó como micoparásito del patógeno *M. perniciosa* o como endófito en la planta hospedera (Hjorth et al., 2003, citado por De Souza et al., 2008). Los frutos enfermos y muertos son colonizados por *T. stromaticum* y causan reducción de la producción de basidiocarpos; por lo tanto, también reducen los niveles de inóculo de basidiosporas y limitan la propagación de la enfermedad en el tejido, además de presentar parasitismo directo sobre el micelio del patógeno (De Souza et al., 2008). *T. stromaticum* se produjo inicialmente a escala piloto y posteriormente de manera comercial, y es utilizado experimentalmente desde 1999 como parte del manejo integrado del cacao (De Souza et al., 2008; De Souza et al., 2006). Sin embargo, el uso comercial de *T. stromaticum* ha presentado resultados variables en campo debido a las condiciones del medio ambiente del cultivo (variabilidad de temperaturas y humedad) que pueden favorecer en ocasiones el desarrollo del patógeno y disminuir el establecimiento del biocontrolador (Meinhardt et al., 2008).

Formulación y técnicas de aplicación

La formulación de microorganismos endófitos enfrenta muchos de los problemas que se presentan en la formulación de otros agentes de control biológico de origen microbiano. Sin embargo, para aquellas especies de endófitos que son transmitidos vía semilla existe una ventaja adicional para su comercialización: no requieren del desarrollo de formulaciones complicadas ni de sistemas especializados de entrega del producto que lo protejan de las diferentes condiciones bióticas y abióticas que pueden afectar su sobrevivencia o eficacia como agente de control biológico, y que generalmente afectan las formulaciones que deben ser aplicadas en campo (Card et al., 2016).

El éxito en la comercialización de microorganismos endófitos se encuentra estrechamente relacionado con algunas de sus características, que, de acuerdo con Card et al. (2016), son importantes durante el desarrollo de un agente de control biológico a base de microorganismos endófitos:

a. El tipo de interacción biológica: mutualismo vs. comensalismo.
b. El nivel de simbiosis: obligada vs. facultativa.
c. El patrón de colonización *in planta*: sistémica vs. local.

d. El grado de especificidad con la planta hospedera: baja vs. alta.

e. El medio de transmisión: horizontal vs. vertical.

f. El mecanismo de acción por el cual ejercen el control: antibiosis *vs*. competencia vs. parasitismo directo *vs*. resistencia inducida.

El método de aplicación de microorganismos endófitos por revestimiento de semillas, aspersión o encapsulación representa varios retos científicos y técnicos relacionados con la formulación, la cual debe garantizar que el microorganismo se establezca en el suelo, cerca de la planta o sobre la misma, además de permitir la penetración y la colonización del hospedero y, a su vez, manejar dosis mínimas y bajo costo (Krell, Jakobs-Schoenwandt, Vidal, & Patel, 2018). Para superar estos retos es necesario entender el ambiente físico-químico y biológico de la filósfera, el suelo, la superficie de la semilla y la rizosfera (Patel, 2014). En el caso de micorrizas, se han reportado suficientes estudios que describen la interacción molecular planta-microorganismo, los cuales permiten el desarrollo de formulaciones novedosas y técnicas de aplicación apropiadas. Lo contrario sucede con los hongos entomopatógenos endófitos, de los cuales se cuenta con muy poca información acerca de los mecanismos de penetración e inoculación de sus plantas hospederas y, en consecuencia, las investigaciones básicas, en su mayoría, se realizan aún mediante la aplicación de suspensiones de esporas en lugar de formulaciones sofisticadas y métodos de aplicación efectivos (Patel, 2014).

Conclusiones y perspectivas

Existen factores limitantes para la producción y la comercialización de productos a base de microorganismos endófitos, dado que el desarrollo de estos productos y su estabilidad en el tiempo requieren de un proceso de investigación bastante largo y, en algunos casos, costoso. En Colombia se evidencia que, a pesar de su condición de país megadiverso, la investigación relacionada con el desarrollo de productos a base de hongos endófitos se encuentra en un nivel poco explorado. En muchos trabajos se aíslan nuevas cepas de endófitos de diferentes sistemas, pero son pocos los casos en que los resultados han llevado al desarrollo de bioproductos de interés comercial.

El potencial de los endófitos para el manejo de insectos plaga y de enfermedades en cultivos de importancia agrícola, la obtención de moléculas de interés en la industria farmacéutica y la bioprospección de estos microorganismos solo se podrá realizar en la medida en que se realicen estudios en campo y se utilicen técnicas precisas para su identificación y su producción a escala industrial.

Para esto se requiere continuar con el descubrimiento de aislamientos endofíticos y la identificación taxonómica de cepas que cuenten con atributos superiores que las hagan candidatas a un proceso de producción y formulación a gran escala, ya sea para su aplicación como microorganismos benéficos o para la obtención de moléculas de interés particular en diferentes industrias.

Así mismo, se requiere incrementar el conocimiento acerca de la interacción ecológica entre la planta hospedera, el hongo endófito, los insectos plaga, los insectos benéficos y los hongos patógenos en diferentes modelos de importancia científica y económica que permitan incrementar la confianza en la aplicación de estas técnicas de manejo de plagas y enfermedades en la agricultura. De esta manera se podrán identificar los potenciales efectos adversos de la aplicación de esta estrategia en diferentes sistemas de producción.

Usando el enfoque del manejo de problemas fitosanitarios mediante la implementación de hongos endófitos se pueden obtener beneficios adicionales en el desarrollo de las plantas, lo cual permitiría un potencial uso de estos microorganismos con propósitos de nutrición vegetal, inducción de resistencia y tolerancia a estreses bióticos y abióticos. Esto, potencialmente, proporcionaría beneficios adicionales al ser incluidos en las etapas tempranas de desarrollo de un cultivo, al tratar las semillas y los sustratos de siembra para obtener un incremento en la proporción de la emergencia en las semillas, mejor establecimiento de las plántulas en los viveros por la inducción del crecimiento de las plantas, así como mejor adaptación en condiciones de campo.

Debido al reciente auge de las investigaciones relacionadas con la aplicación de hongos endófitos en la agricultura y su aceptación en algunos sectores, como la producción de forrajes para ganadería, se han iniciado investigaciones para profundizar el conocimiento acerca del alcance y la persistencia de los hongos endófitos dentro de su hospedero con miras a estructurar la base científica que permita determinar aspectos como los tiempos y las mejores estrategias de aplicación, así como establecer el grado de protección de las plantas y otros beneficios conferidos por estos hongos, lo cual permitirá que esta estrategia se adopte como una herramienta suplementaria en los programas de manejo integrado de plagas y enfermedades.

El desafío en este campo es contribuir al desarrollo del máximo potencial de los microorganismos endófitos mediante investigaciones multidisciplinarias que permitan afrontar diferentes problemas aún no resueltos respecto a las interacciones presentadas bajo condiciones de campo y poder construir herramientas efectivas en el manejo integrado de los diferentes insectos plaga y las enfermedades que afectan a las plantas. El rango de interacciones en que los endófitos asociados con una planta interfieren es muy amplio, por lo que los estudios de la interacción endófito-endófito y endófito-planta hospedera que utilizan herramientas moleculares (genómica, proteómica, metabolómica, secretómica y transcriptómica), biotecnológicas y bioinformáticas de última generación serán claves para comprender su acción mutualista y el aprovechamiento de los metabolitos secundarios.

La interacción de los hongos endófitos con la planta hospedera y entre sí es muy versátil, por lo que pequeñas variaciones en las condiciones del medio ambiente en que se presenta la interacción o en las condiciones y parámetros del cultivo *in vitro* en que se multiplican los endófitos pueden causar variación en la respuesta de la planta hospedera, en los diferentes metabolitos secundarios que se producen durante la interacción, así como en la emisión de semioquímicos usados para mediar en la comunicación de las plantas con los demás organismos de su entorno. Por lo tanto, los estudios que propongan la descripción de las diferentes rutas de comunicación afectadas entre la planta colonizada endofíticamente y su entorno, utilizando para esto las herramientas disponibles y emergentes, permitirán entender el rol de estos microorganismos en el manejo de poblaciones de plagas y el desarrollo de enfermedades en cultivos de importancia comercial. Así mismo, permitirían el desarrollo y la producción industrial de agentes de control biológico para el manejo de problemas fitosanitarios en campo y también de otros metabolitos secundarios, desentrañando así el potencial completo de los endófitos.

Agradecimientos

Los autores agradecen al doctor Stephane Compant, del Instituto Austriaco de Tecnología en Tulln, por su asesoría en la toma de la foto de portada mediante el uso de microscopía confocal. Esta foto es una sección transversal de tejido radicular de maíz donde se muestra un microorganismo endófito marcado con gfp (*green fluorescent protein*) y analizado con el software Imaris (modelación 3D).

Referencias

Akello, J., Dubois, T., Coyne, D., & Kyamanywa, S. (2008). Endophytic *Beauveria bassiana* in banana (*Musa* spp.) reduces banana weevil (*Cosmopolites sordidus*) fitness and damage. *Crop Protection, 27*(11), 1437-1441. doi:10.1016/j.cropro.2008.07.003.

Anjitha, G. (2017). Role of endophytes in insect control. *Acta Scientific Agriculture, 1*(4), 1-3. Recuperado de https://actascientific.com/ASAG/pdf/ASAG-01-0025.pdf.

Aragón, S. M. (2016). *How entomopathogenic endophytic fungi modulate plant-insect interactions* (tesis doctoral). Universidad de Gotinga, Gotinga, Alemania.

Arnold, A. E., Mejía, L. C., Kyllo, D., Rojas, E. I., Maynard, Z., … Herre, E. A. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100*(26), 15649-15654. doi:10.1073/pnas.2533483100.

Azevedo, J. L., Maccheroni Jr, W., Pereira, J. O., & de Araújo, W. L. (2000). Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology, 3*(1) 15-16. doi:10.4067/s0717-34582000000100004.

Backman, P. A., & Sikora, R. A. (2008). Endophytes: An emerging tool for biological control. *Biological Control, 46*(1), 1-3. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.03.009.

Bailey, B., Bae, H., Crozier, J., Thomas, S., Samuels, G. J., Vinyard, B. T., & Holmes, K. (2008). Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control, 46*(1), 24-35. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.01.003.

Battaglia, D., Bossi, S., Cascone, P., Digilio, M. C., Prieto, J. D., Fanti, P., … Trotta, V. (2013). Tomato below ground–above ground interactions: *Trichoderma longibrachiatum* affects the performance of *Macrosiphum euphorbiae* and its natural antagonists. *Molecular Plant-Microbe Interactions, 26*(10), 1249-1256. doi:10.1094/MPMI-02-13-0059-R.

Behie, S. W., Jones, S. J., & Bidochka, M. J. (2015). Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. *Fungal Ecology, 13*, 112-119. doi:10.1016/j.funeco.2014.08.001.

Bischoff, J., & White, J.F., Jr. (2005). Evolutionary development of the Clavicipitaceae. En: J. Dighton, J. F. White, & P. Oudemans (Eds.), *The fungal community: Its organization and role in the ecosystem* (pp. 505-518, 3.ª ed.). Boca Raton, EE. UU.: Taylor & Francis.

Biswas, C., Dey, P., Satpathy, S., & Satya, P. (2012). Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* as a season long endophyte in jute (*Corchorus olitorius*) and its rapid detection using SCAR marker. *BioControl, 57*(4), 565-571. doi:10.1007/s10526-011-9424-0.

Bolwerk, A., Lagopodi, A. L., Lugtenberg, B. J. J., & Bloemberg, G. V. (2005). Visualization of interactions between a pathogenic and a beneficial *Fusarium* strain during biocontrol of tomato foot and root rot. *Molecular Plant-Microbe Interactions, 18*(7), 710-721. doi:10.1094/MPMI-18-0710.

Camino-Sánchez, F. J., Zafra-Gómez, A., Ruiz-García, J., Bermúdez-Peinado, R., Ballesteros, O., Navalon, A., & Vílchez, J. L. (2011). UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 accredited method for the determination of 121 pesticide residues in fruits and vegetables by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis, 23*(3), 427-440. doi:10.1016/j.jfca.2010.11.009.

Card, S., Johnson, L., Teasdale, S., & Caradus, J. (2016). Deciphering endophyte behaviour: the link between endophyte biology and efficacious biological control agents. *FEMS Microbiology Ecology, 92*(8), fiw114. doi.10.1093/femsec/fiw114.

Clay, K., & Schardl, C. L. (2002). Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist, 160*(Suppl. 4), 99-127. doi:10.1086/342161.

Crowder, D. W., & Harwood, J. D. (2014). Promoting biological control in a rapidly changing world. *Biological Control, 75*, 1-7. doi:10.1016/j.biocontrol.2014.04.009.

De Souza, J. T., Bailey, B. A., Pomella, A. W. V., Erbe, E. F., Murphy, C. A., Bae, H., & Hebbar, P. K. (2008). Colonization of cacao seedlings by *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the witches' broom pathogen, and its influence on plant growth and resistance. *Biological Control*, *46*(1), 36-45. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.01.010.

De Souza, J. T., Pomella, A. W. V., Bowers, J. H., Pirovani, C. P., Loguercio, L. L., & Hebbar, K. P. (2006). Genetic and biological diversity of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the cacao witches'-broom pathogen. *Phytopathology*, *96*(1), 61-67. doi:10.1094/PHYTO-96-0061.

Dicke, M., Van Loon, J. J. a., & Soler, R. (2009). Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. *Nature Chemical Biology*, *5*(5), 317-324. doi:10.1038/nchembio.169.

Duijff, B. J., Pouhair, D., Olivain, C., Alabouvette, C., & Lemanceau, P. (1998). Implication of systemic induced resistance in the suppression of *Fusarium* wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* WCS417r and by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *European Journal of Plant Pathology*, *104*(9), 903-910. doi:10.1023/A:1008626212305.

Dutta, D., Puzari, K.C., Gogoi, R., & Dutta, P. (2014). Endophytes: exploitation as a tool in plant protection. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *57*(5), 621-629. doi:10.1590/S1516-8913201402043.

European Food Safety Authority (EFSA). (2012). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* Bipesco 5/F52. *European Food Safety Authority Journal*, *10*(1), 2498. doi:10.2903/j.efsa.2012.2498.

European Food Safety Authority (EFSA). (2013). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substances *Beauveria bassiana* strains ATCC-74040 and GHA1. *European Food Safety Authority Journal*, *11*(1), 3031. doi:10.2903/j.efsa.2013.3031.

Faeth, S. H., Gardner, D. R., Hayes, C. J., Jani, A., Wittlinger, S. K., & Jones, T. A. (2006). Temporal and spatial variation in alkaloid levels in *Achnatherum robustum*, a native grass infected with the endophyte *Neotyphodium*. *Journal of Chemical Ecology*, *32*(2), 307-324. doi:10.1007/s10886-005-9003-x.

Faeth, S. H., & Sullivan, T. J. (2003). Mutualistic asexual endophytes in a native grass are usually parasitic. *The American Naturalist*, *161*(2), 310-325. doi:10.1086/345937.

Feldmann, F., & Hommes, M. (2013). Endophytes for plant protection: the registration process at a glance. En: C. Schneider, C. Leifert, & F. Feldmann (Eds.), *Endophytes for plant protection: the state of the art* (pp. 214-222). Braunschweig, Alemania: Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft.

Fuchs, J. G., Moënne-Loccoz, Y., & Défago, G. (1997). Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 induces resistance to *Fusarium* wilt in tomato. *Plant Disease*, *81*(5), 492-496. doi:10.1094/PDIS.1997.81.5.492.

Garrido-Jurado, I., Resquín-Romero, G., Amarilla, S. P., Ríos-Moreno, A., Carrasco, L., & Quesada-Moraga, E. (2017). Transient endophytic colonization of melon plants by entomopathogenic fungi after foliar application for the control of *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae). *Journal of Pest Science*, *90*(1), 319-330. doi:10.1007/s10340-016-0767-2.

Gunatilaka, A. A. L. (2006). Natural products from plant-associated microorganisms: Distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Journal of Natural Products*, *69*(3), 509-526. doi:10.1021/np058128n.

Herre, E. A., Mejía, L. C., Kyllo, D. A., Rojas, E., Maynard, Z., Butler, A., & Van Bael, S. A. (2007). Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. *Ecology*, *88*(3), 550-558. doi:10.1890/05-1606.

Hu, G., & Leger, R. J. S. (2002). Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(12), 6383-6387. doi:10.1128/AEM.68.12.6383.

Jaber, L. R., & Ownley, B. H. (2018). Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? *Biological Control*, *116*, 36-45. doi:10.1016/j.biocontrol.2017.01.018.

Jaber, L. R., & Vidal, S. (2009). Interactions between an endophytic fungus, aphids and extrafloral nectaries: Do endophytes induce extrafloral-mediated defences in *Vicia faba*? *Functional Ecology*, *23*(4): 707-714. doi:10.1111/j.1365-2435.2009.01554.x.

Jacobson, R. J., Chandler, D., J. Fenlon, J., & Russell, K. M. (2001). Compatibility of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin with *Amblyseius cucumeris* Oudemans (Acarina: Phytoseiidae) to control *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae) on Cucumber plants. *Biocontrol Science and Technology*, *11*(3), 391-400. doi:10.1080/09583150120055808.

Jaimes, Y. Y., Moreno, C. A., & Cotes, A. M. (2009). Inducción de resistencia sistémica contra *Fusarium oxysporum* en tomate por *Trichoderma koningiopsis* th003. *Acta Biológica Colombiana*, *14*(3), 111-120. Recuperado de https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/1344/14224.

Jaimes, Y., & Aranzazu, F. (2010). *Manejo de las enfermedades del cacao (Theobroma cacao L.) en Colombia, con énfasis en monilia (Moniliophthora roreri)*. Recuperado de http://www.fedecacao.com.co/site/images/recourses/pub_doctecnicos/fedecacao-pub-doc_04A.pdf.

Jallow, M. F. A., Dugassa-Gobena, D., & Vidal, S. (2008). Influence of an endophytic fungus on host plant selection by a polyphagous moth via volatile spectrum changes. *Arthropod-Plant Interactions*, *2*(1), 53-62. doi:10.1007/s11829-008-9033-8.

Jani, A. J., Faeth, S. H., & Gardner, D. (2010). Asexual endophytes and associated alkaloids alter arthropod community structure and increase herbivore abundances on a native grass. *Ecology Letters*, *13*(1), 106-117. doi:10.1111/j.1461-0248.2009.01401.x.

Krell, V., Jakobs-Schoenwandt, D., Vidal, S., & Patel, A. V. (2018). Encapsulation of *Metarhizium brunneum* enhances endophytism in tomato plants. *Biological Control*, *116*, 62-73. doi:10.1016/j.biocontrol.2017.05.004.

Kumar, J., Schafer, P., Huckelhoven, R., Langen, G., Baltruschat, H., Stein, E., Nagarajan, S., & Kogel, K.-H. (2002). Bipolaris sorokiniana, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. *Molecular Plant Pathology*, *3*(4), 185-195. doi:10.1046/j.1364-3703.2002.00120.x.

Landa, B. B., López-Díaz, C., Jiménez-Fernández, D., Montes-Borrego, M., Muñoz-Ledesma, F. J., Ortiz-Urquiza, A., & Quesada-Moraga, E. (2013). In-planta detection and monitorization of endophytic colonization by a *Beauveria bassiana* strain using a new-developed nested and quantitative PCR-based assay and confocal laser scanning microscopy. *Journal of Invertebrate Pathology*, *114*(2), 128-138. doi:10.1016/j.jip.2013.06.007.

Lopez, D. C., & Sword, G. A. (2015). The endophytic fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Purpureocillium lilacinum* enhance the growth of cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*) and negatively affect survival of the cotton bollworm (*Helicoverpa zea*). *Biological Control*, *89*, 53-60. doi:10.1016/j.biocontrol.2015.03.010.

Macías-Rubalcava, M. L., Hernández-Bautista, B. E., Oropeza, F., Duarte, G., González, M. C., Glenn, A. E., Hanlin, R. T., & Anaya, A. L. (2010). Allelochemical Effects of Volatile Compounds and Organic Extracts from *Muscodor yucatanensis*, a Tropical Endophytic Fungus from *Bursera simaruba*. *Journal of Chemical Ecology*, *36*(10), 1122-1131. doi:10.1007/s10886-010-9848-5.

Martin, J. H., Mifsud, D., & Rapisarda, C. (2000). The whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) of Europe and mediterranean basin. *Bulletin of Entomological Research*, *90*(5), 407-448. doi:10.1017/S0007485300000547.

Mayoral, F., Benuzzi, M., & Ladurner, E. (2006). Efficacy of the *Beauveria bassiana* strain ATCC 74040 (Naturalis®) against whiteflies on protected crops. *IOBC/wprs Bulletin*, *29*(4), 83-88.

Mejía, L. C., Herre, E. A., Sparks, J. P., Winter, K., García, M. N., Van Bael, S. A., … Bulgheresi, S. (2014). Pervasive effects of a dominant foliar endophytic fungus on host genetic and phenotypic expression in a tropical tree. *Frontiers in Microbiology*, *5*, 479. doi:10.3389/fmicb.2014.00479.

Michaud, J. P., Pell, J. K., & Vega, F. E. (2017). When insect endosymbionts and plant endophytes mediate biological control outcomes. *Biological Control*, *116*, 1-2. doi:10.1016/j.biocontrol.2017.11.003.

Moon, Y. -S., Donzelli, B. G. G., Krasnoff, S. B., McLane, H., Griggs, M. H., Cooke, P., … Churchill, A. C. L. (2008). *Agrobacterium*-mediated disruption of a nonribosomal peptide synthetase gene in the invertebrate pathogen *Metarhizium anisopliae* reveals a peptide spore factor. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(14), 4366-4380. doi:10.1128/AEM.00285-08.

Nielsen, C., Vestergaard, S., Harding, S., Wolsted, C., & Eilenberg, J. (2006). Biocontrol science and technology biological control of *Strophosoma* spp. (Coleoptera : Curculionidae) in greenery (*Abies procera*) plantations using Hyphomycetes. *Biocontrol Science and Technology*, *16*(6), 583-598. doi:10.1080/09583150500532824.

Ownley, B. H., Griffin, M. R., Klingeman, W. E., Gwinn, K. D., Moulton, J. K., & Pereira, R. M. (2008). *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. *Journal of Invertebrate Pathology*, *98*(3), 267-270. doi:10.1016/j.jip.2008.01.010.

Ownley, B. H., Gwinn, K. D., & Vega, F. E. (2010). Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: Ecology and evolution. *BioControl*, *55*(1), 113-128. doi:10.1007/s10526-009-9241-x.

Parsa, S., Ortiz, V., & Vega, F. E. (2013). Establishing fungal entomopathogens as endophytes: Towards endophytic biological control. *Journal of Visualized Experiments*, *74*, e50360. doi:10.3791/50360.

Patel, A. (2014). Introduction. En: Jakobs-Schönwandt, D., Döring, M., Patel, A., (Eds.), *Application Techniques of Endophytes* (pp. 17-22). Bielefeld, Alemania: Fachhochschule Bielefeld.

Pieterse, C. M. J., Poelman, E. H., Van Wees, S. C. M., & Dicke, M. (2013). Induced plant responses to microbes and insects. *Frontiers in Plant Science*, *4*, 475. doi:10.3389/fpls.2013.00475.

Poelman, E. H., Bruinsma, M., Zhu, F., Weldegergis, B. T., Boursault, A. E., Jongema, Y., … Dicke, M. (2012). Hyperparasitoids use herbivore-induced plant volatiles to locate their parasitoid host. *Plos Biology*, *10*(11), e1001435. doi:10.1371/journal.pbio.1001435.

Posada, F., Aime, M. C., Peterson, S. W., Rehner, S. A., & Vega, F. E. (2007). Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota:

Hypocreales). *Mycological Research*, *111*(6), 748-757. doi:10.1016/j.mycres.2007.03.006.

Quesada-Moraga, E., Landa, B. B., Muñoz-Ledesma, J., Jiménez-Diáz, R. M., & Santiago-Álvarez, C. (2006a). Endophytic colonisation of opium poppy, *Papaver somniferum*, by an entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain. *Mycopathologia*, *161*(5), 323-329. doi:10.1007/s11046-006-0014-0.

Quesada-Moraga, E., Ruiz-García, A., & Santiago-Alvarez, C. (2006b). Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against puparia and adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, *99*(6), 1955-1966. doi:10.1603/0022-0493-99.6.1955.

Ravensberg, W. J. (2015). Commercialisation of microbes: Present situation and future prospects. En: B. Lugtenberg (Ed.), *Principles of plant-microbe interactions: Microbes for sustainable agriculture* (pp. 309-317). Leiden, Holanda: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-08575-3_32.

Resquín-Romero, G., Garrido-Jurado, I., Delso, C., Ríos-Moreno, A., & Quesada-Moraga, E. (2016). Transient endophytic colonizations of plants improve the outcome of foliar applications of mycoinsecticides against chewing insects. *Journal of Invertebrate Pathology*, *136*, 23-31. doi:10.1016/J.JIP.2016.03.003.

Ríos-Moreno, A., Carpio, A., Garrido-Jurado, I., Arroyo-Manzanares, N., Lozano-Tovar, M. D., & Arce, L. (2016a). Production of destruxins by *Metarhizium* strains under different stress conditions and their detection by using UHPLC-MS/MS. *Biocontrol Science and Technology*, *26*(9), 1298-1311. doi:10.1080/09583157.2016.1195336.

Ríos-Moreno, A., Grarrido-Jurado, I., Resquín-Romero, G., Arroyo-Manzanares, N., Arce, L., & Quesada-Moraga, E. (2016b). Destruxin A production by *Metarhizium brunneum* strains during transient endophytic colonization of *Solanum tuberosum*. *Biocontrol Science and Technology*, *26*(11), 1574-1585. doi:10.1080/09583157.2016.1223274.

Rodriguez-Saona, C., Blaauw, D. R., & Isaacs, R. (2012). Manipulation of natural enemies in agroecosystems: Habitat and semiochemicals for sustainable insect pest control. En: M. L. Larramendy & S. Soloneski (Eds.), *Integrated Pest Management and Pest Control – Current and Future Tactics* (pp. 89-126). Rijeka, Croacia: InTech.

Rodriguez, R. J., White, J. F., Arnold, A. E., & Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *The new Phytologist*, *182*(2), 314-330. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x.

Rohlfs, M., & Churchill, A. C. L. (2011). Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. *Fungal Genetics and Biology*, *48*(1), 23-34. doi:10.1016/J.FGB.2010.08.008.

Saikkonen, K., Faeth, S. H., Helander, M., & Sullivan, T. J. (1998). Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *29*, 319-343. doi:10.1146/annurev.ecolsys.29.1.319.

Saikkonen, K., Helander, M., Faeth, S. H., Schulthess, F., & Wilson, D. (1999). Endophyte-grass-herbivore interactions: the case of *Neotyphodium* endophytes in Arizona fescue populations. *Oecologia*, *121*(3), 411-420. doi:10.1007/s004420050946.

Saikkonen, K., Helander, M., Ranta, H., Neuvonen, S., Virtanen, T., Suomela, J., & Vuorinen, P. (1996). Endophyte-mediated interactions between woody plants and insect herbivores? *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *80*, 269-271. doi:10.1111/j.1570-7458.1996.tb00932.x.

Saikkonen, K., Ion, D., & Gyllenberg, M. (2002). The persistence of vertically transmitted fungi in grass metapopulations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *269*(1498), 1397-1403. doi:10.1098/rspb.2002.2006.

Sánchez-Fernández, R. E., Sánchez-Ortiz, B. L., Sandoval-Espinosa, Y. K., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M. C., & Macías-Rubalcava, M. L. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP: Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, *16*(2), 132-146. doi:10.1016/S1405-888X(13)72084-9.

Scott, R., & Carris, L. (1996). *Endophytic fungi in grasses and woody plants: systematics, ecology, and evolution*. Minnesota, EE. UU.: APS Press.

Schulz, B., & Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological Research, 109*(6), 661-686. doi:10.1017/S095375620500273X.

Schulz, B., & Boyle, C. (2006). What are Endophytes? En: B. Schulz, C. Boyle, & T. Sieber (Eds.), *Microbial Root Endophytes* (Soil Biology, vol. 9, pp. 1-14). Berlín, Alemania: Springer. doi:10.1007/3-540-33526-9.

Singh, L. P., Gill, S. S., & Tuteja, N. (2011). Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior, 6*(2), 175-191. doi:10.4161/psb.6.2.14146.

Stone, J. K., Bacon, C. W., & White Jr, J. F. (2000). An overview of endophytic microbes: Endophytism defined. En: C. W. Bacon & J. F. White (Eds.), *Microbial Endophytes* (pp. 4-5). Nueva York, EE. UU.: Marcel Dekker.

Strobel, G., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67*(4), 491-502. doi:10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003.

Sun, X., & Guo, L. G. (2012). Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques. *Mycology, 3*(1), 65-76. doi:10.1080/21501203.2012.656724.

Szendrei, Z., & Rodriguez-Saona, C. (2010). A meta-analysis of insect pest behavioral manipulation with plant volatiles. *Entomologia Experimentalis et Applicata, 134*(3), 201-210. doi:10.1111/j.1570-7458.2009.00954.x.

Tanaka, A., Tapper, B. A., Popay, A., Parker, E. J., & Scott, B. (2005). A symbiosis expressed non-ribosomal peptide synthetase from a mutualistic fungal endophyte of perennial ryegrass confers protection to the symbiotum from insect herbivory. *Molecular Microbiology, 57*(4), 1036-1050. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04747.x.

Ten Hoopen, G. M., Deberdt, P., Mbenoun, M., & Cilas, C. (2012). Modelling cacao pod growth: implications for disease control. *Annals of Applied Biology, 160*(3), 260-272. doi:10.1111/j.1744-7348.2012.00539.x.

Ten Hoopen, G. M., & Krauss, U. (2016). Biological control of cacao diseases. En: B. A. Bailey & L. W. Meinhardt (Eds.), *Cacao diseases* (pp. 511-566). Cham, Suiza: Springer. doi:10.1007/978-3-319-24789-2_17.

Thakur, A., Kaur, S., Kaur, A., & Singh, V. (2013). Enhanced resistance to *Spodoptera litura* in endophyte infected cauliflower plants. *Environmental Entomology, 42*(2), 240-246. doi:10.1603/EN12001.

Vega, F. E. (2008). Insect pathology and fungal endophytes. *Journal of Invertebrate Pathology, 98*(3), 277-279. doi:10.1016/j.jip.2008.01.008.

Vega, F. E., Goettel, M. S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M. A., Keller, S., … Roy, H. E. (2009). Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology, 2*(4), 149-159. doi:10.1016/J.FUNECO.2009.05.001.

Verma, S., Varma, A., Rexer, K.-H., Hassel, A., Kost, G., Sarbhoy, A., … Franken, P. (1998). *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a New root-colonizing fungus. *Mycologia, 90*(5), 896-896. doi:10.2307/3761331.

Vidal, S., & Jaber, L. R. (2015). Entomopathogenic fungi as endophytes: plant–endophyte–herbivore interactions and prospects for use in biological control. *Current Science, 109*(1), 46-54.

Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., … Kogel, K. -H. (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102*(38), 13386-13391. doi:10.1073/pnas.0504423102.

Wang, Y., & Guo, L. (2007). A comparative study of endophytic fungi in needles, bark, and xylem of *Pinus tabulaeformis*. *Canadian Journal of Botany, 85*(10), 911-917. doi:10.1139/B07-084.

Webber, J. (1981). A natural control of Dutch elm disease. *Nature, 292*, 449-451. doi:10.1038/292449a0.

Zhang, L. (2014). *Colonization pattern of crop plants by endophytic fungi* (tesis doctoral). Universidad de Gotinga, Gotinga, Alemania.

Capítulo 20

Nuevas estrategias para el control biológico de fitopatógenos

Chapter 20

Novel strategies for plant pathogens biological control

Alba Marina Cotes,[1] Stephen Mosher,[1]
Gloria Patricia Barrera,[1] Sadao Kobayashi,[1] Yigal Elad[2]

[1] Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA)

[2] Department of Plant Pathology and Weed Sciences, ARO, The Volcani Center

Contenido

Introducción 882

Uso de consorcios microbianos en el control biológico 882

Bioplaguicidas con actividad biofertilizante y biorremediadora 884

Screening de alta eficiencia para el descubrimiento de nuevos agentes de control biológico 886

- *Screening* a nivel organísmico 887
- *Screening* al nivel de bioactividad 889
- Consideraciones finales 890

Control biológico de virus de plantas 890

Control biológico de bacterias fitopatógenas con fagos 891

Endófitos 895

Bioestimulantes para mejorar la actividad de los microorganismos biocontroladores 896

- Ácidos húmicos y fúlvicos 896
- Hidrolizados de proteínas y otros compuestos que contienen nitrógeno 896
- Extractos de algas marinas y plantas 897
- Quitina, quitosán y otros biopolímeros 898

Aplicaciones del microbioma presente en distintos tejidos de la planta 899

Elicitores 902

RNAi: nueva estrategia de control de fitopatógenos basada en silenciamiento génico 905

- ARN de interferencia 905
- Antecedentes 905
- Funcionamiento 906
- Aplicaciones 906
- Consideraciones finales 908

Conclusiones y perspectivas 909

Referencias 910

Resumen

Las tecnologías biológicas, incluyendo el uso de microorganismos biocontroladores, están adquiriendo una importancia primordial en la producción agrícola. Sin embargo, la mayoría de los enfoques para el control biológico de enfermedades de las plantas ha tenido un alcance limitado. Un ejemplo de esto lo representa el hecho de que, en las últimas décadas, en general, se han utilizado agentes de biocontrol individuales para controlar un solo patógeno. Esto puede explicar parcialmente la respuesta inconsistente que se observa frecuentemente, ya que dichos agentes individuales pueden ser inactivos en varios de los ambientes en los que se aplican o contra diferentes patógenos que atacan a la planta huésped. Lograr un control de amplio espectro de patógenos por los antagonistas que se apliquen individualmente o en consorcio sigue siendo, en gran medida, un objetivo no cumplido para la explotación eficaz del control biológico, así como ampliar los usos de los agentes de control biológico para lograr efectos complementarios, tales como tolerancia a factores abióticos limitantes como la sequía y la salinidad, biofertilización y biorremediación, entre otros. Además, en general, se han usado los mismos microorganismos biocontroladores y los descubrimientos de nuevos agentes de control biológico son muy limitados. Sin embargo, estas investigaciones requieren de métodos de tamizado o *screening* de alta eficiencia que permitan evaluar de forma rápida muchos microorganismos. De otra parte, existen múltiples patógenos para los cuales no se han desarrollado alternativas de control biológico efectivas, como es el caso de muchas bacterias fitopatógenas y de virus, donde existe un potencial inexplorado. Así mismo, el desarrollo de nuevos componentes de manejo que puedan integrarse a los agentes de control biológico para mejorar la respuesta de control tiene aún mucho espacio de investigación.

Palabras clave

ARNi, bacteriófagos, bioestimulantes, biofertilización, bioplaguicidas, biorremediación, consorcios microbianos, elicitores, endófitos, *screening*, virus fitopatógenos

Abstract

Biological technologies, including the use of biocontrol microorganisms, are of primary importance in agricultural production. However, most approaches to biological control of plant diseases have had limited success. An example of this is the fact that in recent decades, individual biocontrol agents have been used to control single pathogens. This may partly explain some of the inconsistent field results, given that individual biological control agents may be inactive in certain agricultural environments in which they are applied or may be ineffective in controlling the various pathogens that attack host plants. Achieving broad-spectrum pathogen control by antagonists that are applied individually or in consortium remains largely an unfulfilled goal for the effective exploitation of biological control. Broadening the use of biological control agents to achieve complementary effects, such as tolerance to limiting abiotic factors such as drought and salinity, biofertilization and bioremediation, among others is also of interest. In addition, the same general biocontrol microorganisms have been used, with very limited discoveries of new biological control agents. However, these investigations require highly efficient screening methods that permit the rapid exploration of many microorganisms. On the other hand, there are multiple pathogens for which no effective biological control alternatives have been developed. This is the case for many phytopathogenic bacteria and viruses, with unexplored potential. Also, the development of new management components that can be integrated with biological control agents to improve the control response has ample room for development and improvement. For example, the discovery and use of elicitors and biostimulating substances is still limited, with the potential for advancement. The same is true for the incorporation of emerging technologies for phytoprotection such as interfering RNA, which open up new possibilities for the sustainable production of crops. With these ideas in mind, this chapter seeks to discuss and expand upon these ideas.

Keywords

Bacteriophages, bioestimulants, biofertilization, biopesticides, bioremediation, elicitors, endophytes, microbial consortia, phytopathogenic viruses, screening, RNAi

Introducción

Los bioplaguicidas son una herramienta ambientalmente amigable y reconocida como un componente importante para el manejo integrado de plagas (MIP), por lo que su combinación con otras opciones biológicas "blandas" ha venido ganando interés. Sin embargo, dada la presión creciente en la agricultura para producir más alimento en menos tierra, se plantea la necesidad continua de estimular nuevos desarrollos que garanticen la salud vegetal de forma integral y no solamente el manejo de un patógeno particular. En este capítulo se muestran algunas opciones que podrían ampliar el espectro de uso del control biológico y el desarrollo de nuevos componentes de manejo que podrían integrase con los agentes de control biológico.

Uso de consorcios microbianos en el control biológico

A pesar de los resultados promisorios obtenidos en el control biológico de fitopatógenos, también se han encontrado resultados inconsistentes y variabilidad en su eficacia. Los factores que afectan la actividad de los agentes de control biológico han sido atribuidos a los ambientes adversos (humedad o desecación extremas, temperatura, luz ultravioleta, características fisicoquímicas y microbiológicas del suelo), a variaciones entre los cultivares objeto de control (exudados, características físicas) y a la interacción entre todos los factores. Esto, sumado a la variación en las prácticas del cultivo (culturales, agroquímicos, otros bioinsumos, etc.), hace que con frecuencia un solo microorganismo no puede reaccionar a estos factores de inestabilidad y, a la vez, mantener su actividad bioocontroladora.

La actividad microbiológica depende de la cantidad de agua y oxígeno disponibles. La porosidad del suelo influencia estos parámetros y además existe una relación entre estos factores y los efectos indirectos de las prácticas de manejo del suelo, tales como la labranza (Skopp, Jawson, & Doran, 1990).

De otra parte, se debe considerar que el control biológico de amplio espectro de enfermedades causadas por patógenos vegetales como *Pythium*, *Phytophthora* y *Rhizoctonia solani*, entre otros, requiere la introducción o la presencia de fuentes edáficas de nutrientes orgánicos en el suelo para el sustento de los agentes de biocontrol. El nivel de descomposición de la materia orgánica afecta de manera crítica la composición de los taxa microbianos, así como las poblaciones y las actividades de los agentes de control biológico. La competencia, la antibiosis, el parasitismo y la resistencia inducida se ven afectados. Por ejemplo, las fuentes altamente estabilizadas de turba, frecuentemente, no le dan soporte a los biocontroladores aplicados. Por otra parte, el compost puede servir como una base de nutrición ideal para agentes de biocontrol y ofrece una oportunidad para introducir y establecer agentes específicos de biocontrol en los suelos, lo que, a su vez, conduce a un control biológico sostenido basado en las actividades de las comunidades microbianas (Hoitink & Boehm, 1999).

Los cambios en la composición de la comunidad microbiana del suelo alteran la capacidad fisiológica de dicha comunidad, lo cual tiene consecuencias no solamente sobre los biocontroladores introducidos, sino sobre el ecosistema. Se debe considerar que el uso sucesivo de los suelos para cultivo, además de afectar su química y su estructura, reduce la actividad biológica debido a la disminución de macroagregados que proporcionan un microhábitat importante para la actividad microbiana. La evidencia indirecta sugiere que las enmiendas del suelo, como los abonos animales y verdes y la diversidad de plantas (rotaciones de cultivos), pueden ser más importantes para mantener la actividad y la diversidad microbiana del suelo que la labranza de conservación en sistemas de monocultivo. Cada vez hay más pruebas de que la rotación de cultivos promueve la productividad mediante la supresión de

microorganismos deletéreos que proliferan bajo el monocultivo. Se ha demostrado que las aplicaciones repetidas de agroquímicos (fertilizantes, plaguicidas y herbicidas) pueden suprimir el potencial biológico de los suelos manejados convencionalmente (Chen, Edwards, & Subler, 2001; Dick, 1992).

Una tendencia emergente es el uso de mezclas de microorganismos compatibles y diversos, ya que se ha demostrado que múltiples microorganismos pueden ser superiores en su efecto biocontrolador que uno solo, pues proporcionan mayor eficacia, consistencia y confiabilidad cuando son evaluados en diferentes campos (figura 20.1) (Kloepper et al., 2004; Stockwell, Johnson, Sugar, & Loper, 2011). Además, la combinación de microorganismos puede aumentar el espectro de acción para controlar diversas enfermedades en el mismo cultivo. Adicional al mayor control de las enfermedades, se ha observado un aumento en el efecto promotor del crecimiento vegetal al utilizar consorcios microbianos basados en diversos biocontroladores, tales como *Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Bacillus* spp., etc., en trigo, rábano, garbanzo, tomate, pimiento, *Arabidopsis* y guisante (Duffy, Simon, & Weller, 1996; Jetiyanon, 2007; Kannan & Sureendar, 2009; Rudresh, Shivaprakash, & Prasad, 2005; Srinivasan & Mathivanan, 2011). Así mismo, una mezcla de *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma hamatum* y *Streptomyces coelicolor* redujo el marchitamiento vascular producido por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Ochoa & Cotes, 1998). Otra mezcla con base en *Pseudomonas aeruginosa*, *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* mostró capacidad para estimular respuestas de defensa en guisantes contra *Sclerotinia sclerotiorum* (Jain, Poulos, Gros, Chakravarty, & Shuman, 2011) y una mezcla de *B. subtilis* con *T. harzianum* suprimió eficazmente la marchitez por *Fusarium* en garbanzo mediante inducción de resistencia sistémica (Moradi, Bahramnejad, Amini, Siosemardeh, & Haji-Allahverdipoor, 2012).

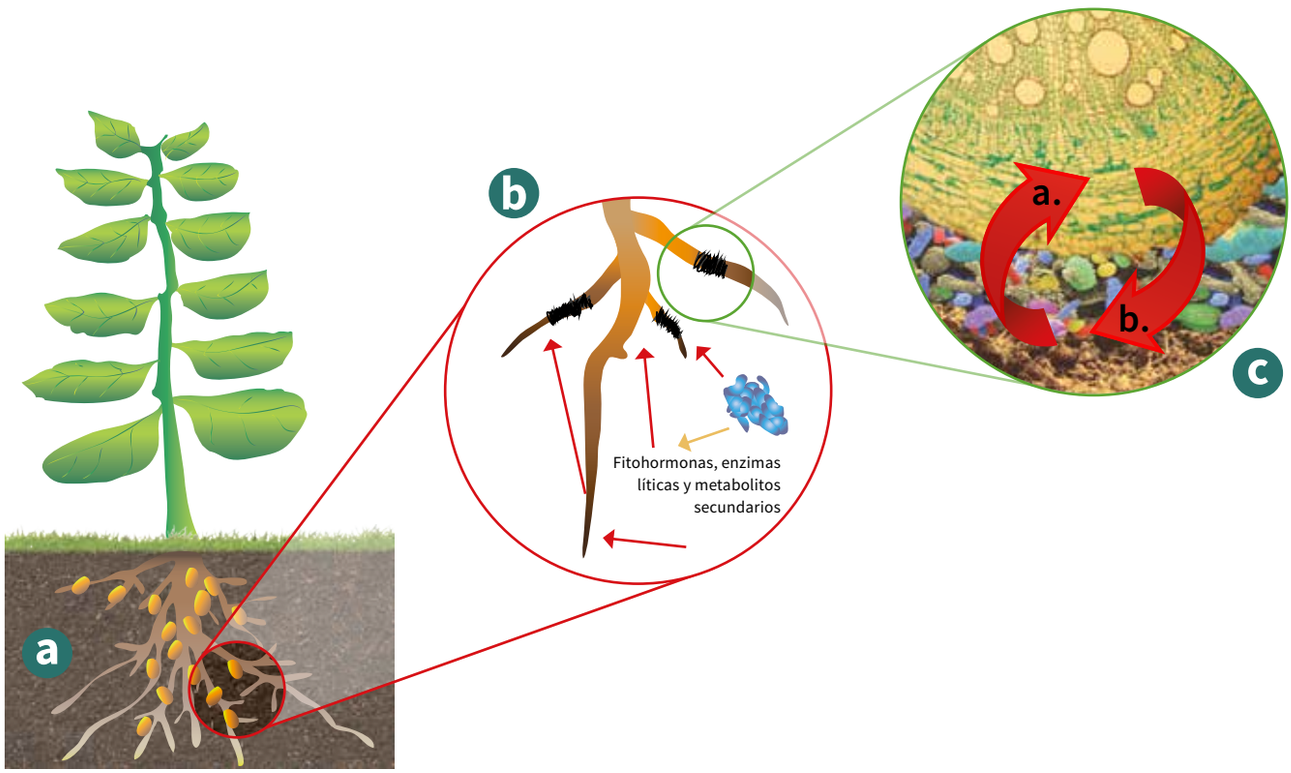


Figura 20.1. Consorcios microbianos y salud vegetal. a. Colonización de los microorganismos en la rizosfera; b. Efecto de control biológico mediante mecanismos de acción complementarios; c. Interacción entre la raíz, el patógeno, el biocontrolador y el microbioma del suelo.

Fuente: Elaboración propia

De otra parte, se demostró que dos consorcios, el primero basado en *Bacillus licheniformis* con *Bacillus* sp., *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptomyces fradiae* y el segundo consistente en *B. licheniformis*, *Bacillus* sp. y *P. aeruginosa*, controlaron el virus de la necrosis del girasol y mejoraron significativamente los rendimientos del cultivo (Srinivasan & Mathivanan, 2011). Así mismo, se han sobrepasado los límites de la fitopatología utilizando mezclas de cepas de entomopatógenos con antagonistas. En un consorcio constituido por *B. bassiana* y *P. fluorescens* se logró el control simultáneo del minador de hojas (*Aproaerema modicella*) en cacahuetes y de *Sclerotium rolfsii* cuando se aplicó a las semillas, al suelo y al follaje para el control simultáneo (Senthilraja et al., 2010). Una mezcla basada en un granulovirus y en *Trichoderma koningiopsis*, al ser aplicada sobre tubérculos de papa, controló simultáneamente a la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* y *Rhizoctonia solani* (Santos, Villamizar, García, Beltrán, & Cotes, 2016). También se han desarrollado estudios que evalúan consorcios microbianos compatibles que, además de tener efectos antagonistas contra los fitopatógenos, participan en la conversión de nutrientes y en su movilidad.

Bioplaguicidas con actividad biofertilizante y biorremediadora

Los microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPM, por la sigla en inglés de *plant growth-promoting microorganism*) son heterogéneos en su naturaleza, comprenden bacterias, hongos y actinomicetos que sobreviven en y alrededor de la rizosfera y mejoran el crecimiento de la planta y el rendimiento, ya sea directa o indirectamente (Hariprasad, Navya, Chandra, & Niranjana, 2009). Un PGPM eficaz, además de ser competente en la rizosfera, debe ser capaz de hacer frente al estrés biótico y abiótico y de desarrollar múltiples funciones. La promoción directa del crecimiento de las plantas implica la solubilización o movilización de nutrientes importantes (fósforo, potasio, zinc, azufre y hierro) o la fijación de nitrógeno atmosférico para la absorción de las plantas. También se sabe que estos producen varias fitohormonas que promueven el crecimiento de las plantas, como el ácido indolacético, el ácido giberélico, las citoquininas y el etileno (Arshad & Frankenberger, 1993), y reducen el efecto deletéreo de los fitopatógenos (Maiyappan, Amalraj, Santhosh, & Peter, 2010).

Microorganismos biocontroladores tales como *Trichoderma* spp., *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp., además de ejercer su efecto primario de control, pueden estimular el crecimiento de la planta (efecto secundario) en ausencia del patógeno (Kloepper, Lifshitz, & Zablotowicz, 1989; Li et al., 2015; Rajasekhar, Satish, Sain, & Divya, 2016). Así mismo, los microorganismos biofertilizantes pueden ejercer actividad biocontroladora. Por ejemplo, al utilizar la bacteria *Rhizobium* spp. como promotor de crecimiento, además de mejorar la productividad de las plantas (efecto primario), tuvo efecto en el control de enfermedades (efecto secundario) (Rajasekhar et al., 2016).

En un estudio de invernadero realizado por Raupach y Kloepper (1998), se demostró que las rizobacterias promotoras del crecimiento (*plant growth promoting rhizobacteria* [PGPR, por la sigla en inglés]) *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* y *Curtobacterium flaccumfaciens*, al ser usadas tanto individualmente como en mezcla, fueron efectivos biocontroladores contra múltiples patógenos del pepino. La mezcla, al ser aplicada en semillas, demostró una alta promoción del crecimiento de las plantas y una reducción significativa de la enfermedad. De manera similar, los tetrainoculantes (*Mesorhizobium-Azotobacter-Pseudomonas-Trichoderma*) demostraron atributos significativos de crecimiento, rendimiento y control de fitopatógenos cuando se aplicaron a las semillas de garbanzo (Prakash Verma, Yadav, Tiwari, & Jaiswal, 2013).

Teniendo en cuenta las múltiples funciones que pueden tener los microorganismos benéficos y las interacciones que establecen con las plantas, es posible desarrollar productos multifunción, dependiendo de los efectos positivos que puedan generar y de sus modos de acción. Estos productos pueden utilizarse como bioplaguicidas, fitoestimuladores, biofertilizantes, biorremediadores e inductores de resistencia frente a factores abióticos como sequía y salinidad, entre otros.

En el caso de las bacterias promotoras del crecimiento (PGPR), que además están relacionadas con la salud vegetal, se les atribuyen mecanismos variados como solubilización de fosfatos, producción de sideróforos, fijación biológica de nitrógeno, ingeniería de la rizosfera, producción de 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa (ACC), interferencia de la señal *quorum sensing* (QS) e inhibición de la formación de biopelículas, producción de fitohormonas, actividad antifúngica, producción de compuestos orgánicos volátiles (*volatile organic compounds* [VOC, por la sigla en inglés]), inducción de resistencia sistémica, estimulación de microorganismos benéficos vegetales e interferencia en la producción de las toxinas de los patógenos (Bhattacharyya & Jha, 2012).

Además de su capacidad biodegradadora derivada de sus actividades enzimáticas, de tipo quitinasa, β-1, 3-glucanasa y celulasa (Nielsen & Sørensen, 1997; Sindhu & Dadarwal, 2001), pectinasas, proteasas y amilasas (De Vasconcellos & Cardoso, 2009; O'Sullivan, Stephens, & O'Gara, 1991), estas bacterias han demostrado capacidad para reducir factores de estrés abiótico como la salinidad o la sequía (Yang, Kloepper, & Ryu, 2009) o para biorremediar los suelos y el agua. Los microorganismos son mucho más sensibles al estrés causado por metales pesados que los animales del suelo o que las plantas que crecen en los mismos suelos, por lo tanto, estos metales producen cambios en la función microbiana y, en consecuencia, en la biodiversidad dentro de las poblaciones y en las comunidades microbianas (Giller, Witter, & Mcgrath, 1998). Bacterias tales como *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. pueden biorremediar metales pesados tales como cadmio y níquel (Andreoni, Colombo, Colombo, Vecchio, & Finoli, 2003; Guo et al., 2010; Qian et al., 2012), petróleo (Das & Mukherjee, 2007; Jalilzadeh Yengejeh et al., 2014; Zhu, Zhang, Chen, Cai, & Lin, 2016); PAH (por la sigla en inglés de *polycyclic aromatic hydrocarbons*) (Hunter, Ekunwe, Dodor, Hwang, & Ekunwe, 2005) y plaguicidas, tales como el methyl parathion y el diazinon (Abo-Amer, 2011).

Así mismo, algunos microorganismos como *Trichoderma* spp., además de su demostrada actividad biocontroladora, también influencian el desarrollo vegetal mediante la solubilización de fosfato y micronutrientes (Altomare, Norvell, Björkman, & Harman, 1999; Li et al., 2015), la producción de fitohormonas (Cai et al., 2013; Vinale et al., 2006), la inducción de resistencia sistémica (Cai et al., 2013; Moreno et al., 2009), la reducción de contaminantes orgánicos e inorgánicos y la regulación de la microflora rizosférica (Adams, De-Leij, & Lynch, 2007; Huang, Chen, Ran, Shen, & Yang, 2011). Ha demostrado capacidad para degradar cianuro (Ezzi & Lynch, 2005) y compuestos fenólicos mediante la producción de la enzima lacasa (Chakroun, Mechichi, Martinez, Dhouib, & Sayadi, 2010), así como hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), muchos de los cuales son tóxicos, mutágenos o cancerígenos (Matsubara, Lynch, & De Leij, 2006), metales pesados tales como el cadmio y el níquel (Nongmaithem, Roy, & Bhattacharya, 2016) y plaguicidas como la atrazina ($C_8H_{14}ClN_5$), que es un herbicida con acción sistémica tóxica a corto y mediano plazo, ya que no se degrada fácilmente e inhibe la fotosíntesis.

Además, este compuesto causa serios cambios ambientales y es un interruptor endocrino (DE), pues afecta la función reproductiva en los vertebrados y causa efectos teratogénicos en los seres humanos (Cooper et al., 2007; Raymundo Raymundo et al., 2009). *Trichoderma* también degrada organofosforados, los cuales, debido a su solubilidad en agua, son capaces de infiltrarse a través del suelo y de causar daños ambientales considerables (Zhang, Bruton, Howell, & Miller, 1999).

Este efecto simultáneo del control de fitopatógenos y de la reducción de factores de estrés para la planta mediante la biorremediación de xenobióticos (compuestos tóxicos), que además causan serios problemas ambientales y ponen en peligro la salud humana y animal, es muy deseable dentro de una agricultura sostenible. Por lo tanto, en el futuro se esperan bioproductos que puedan cumplir múltiples funciones que favorezcan a la planta y al medioambiente. Sin embargo, esto solo será posible si se llevan a cabo investigaciones interdisciplinarias que combinen los conocimientos de los expertos en diferentes aplicaciones, tales como control biológico, biofertilización, biorremediación, interacciones planta-microorganismo, benéfico-patógeno y su señalización con el medioambiente, además de fermentación, formulación, gestión empresarial innovadora, comercialización de bioplaguicidas y educación de los usuarios potenciales de estas tecnologías

y del público en general. Visualizando las historias de éxito de la combinación de consorcios microbianos que interactúan sinérgicamente sobre microorganismos individuales, actualmente se están diseñando consorcios con mayor alcance, ya que se busca que intervengan en el manejo de cultivos. Esto, por supuesto, implicará el abordaje de la extrema complejidad de las interacciones y de las deficiencias actuales, así como de las áreas potenciales que se requieren para superar futuras investigaciones. En la figura 20.2 se ejemplifican los efectos más importantes que pueden tener los microorganismos biocontroladores.

Figura 20.2. Múltiples efectos de los microorganismos biocontroladores.

Fuente: Elaboración propia

Screening de alta eficiencia para el descubrimiento de nuevos agentes de control biológico

Para desarrollar agentes de control biológico eficaces para el manejo de fitopatógenos, las colecciones microbianas deben someterse a paradigmas de *screening* eficientes con el objetivo de identificar candidatos de alta calidad con potencial para controlar la enfermedad de interés en entornos agrícolas. Para la selección de los agentes de control biológico se considera, en primer lugar, al patógeno objetivo que causa la enfermedad y, posteriormente, el sistema de ensayo que permita establecer los rasgos microbianos

antagónicos de este patógeno. Los microorganismos candidatos que son seleccionados a través de ensayos de detección de biocontroladores potenciales se someten a otras pruebas, tales como la optimización del efecto de biocontrol y la evaluación de los riesgos asociados que pueden tener estos agentes para evitar organismos que causen problemas ambientales o enfermedades en humanos (Alabouvette & Cordier, 2011).

Con el objetivo de poner el agente de control biológico en el mercado, la identificación de microorganismos candidatos *in vitro* en condiciones de laboratorio es solo el punto de partida. Los potenciales agentes de control biológico seleccionados se llevan luego a ensayos en plantas, tanto en invernadero como en el campo. Debido a que los ensayos *in vivo* proporcionan condiciones experimentales que pueden ser muy diferentes en comparación con las condiciones *in vitro*, los microorganismos que se desempeñan bien en los ensayos simples de detección a menudo fracasan en entornos más complejos. Idealmente, con suficientes recursos, la selección de biocontroladores siempre tendría que hacerse en condiciones de semicampo o de campo. Desafortunadamente, el esfuerzo de probar cientos a miles de aislamientos microbianos en campo es prohibitivo, incluso en los entornos de investigación bien financiados. Por lo tanto, el desarrollo de métodos robustos de *screening* es crucial para mejorar la tasa de éxito de los ensayos de campo.

El aislamiento de microorganismos, la evaluación de su actividad y el establecimiento de colecciones (bancos de germoplasma) en las cuales se preserven las características de origen de cada cepa son etapas indispensables en el desarrollo de bioplaguicidas. El aislamiento de los potenciales agentes de control biológico se ha hecho principalmente en nichos ecológicos que muestran actividades microbianas benéficas, tales como suelos supresivos de enfermedades o plantas sanas desarrolladas en campos donde haya alta incidencia de la enfermedad (Fravel, 2005; Montesinos, 2003). Una vez establecidas estas colecciones de microorganismos, se someten a ensayos para seleccionar los candidatos más prometedores. Muchos autores han documentado diversos rasgos microbianos y modos de acción que están correlacionados con el control biológico (Campbell, 1991; Howell, 2003; Kesarcodi-Watson, Kaspar, Lategan, & Gibson, 2008; Roberts & Lohrke, 2003). Debido a esto, algunos grupos de investigación se han enfocado en los sistemas de *screening* que identifican microorganismos, independientemente de su modo de acción, que excluyen al patógeno objetivo a nivel organísmico. En los últimos años, sin embargo, los investigadores están comenzando a centrarse en actividades específicas. Tal es el caso del *screening* de alto rendimiento a nivel organísmico y a nivel de bioactividades específicas a las que se referirá este documento.

Screening a nivel organísmico

Los hongos y los oomicetos patógenos de plantas, como *Fusarium* spp., *Gaeumannomyces graminis*, *Verticillium* spp., *Phytophthora* spp., *Pythium* spp. y *Rhizoctonia solani*, pueden afectar considerablemente la productividad de los sistemas agrícolas (Pliego, Ramos, De Vicente, & Cazorla, 2011). Habitualmente los ensayos clásicos *in vitro* para identificar actividades bacterianas antagónicas al crecimiento de hongos se evalúan midiendo zonas de inhibición del crecimiento caracterizadas por un área libre en medio del cultivo sólido, entre las colonias bacterianas y las hifas de hongos, en un ambiente de cocultivo. Los potenciales agentes de control biológico se clasifican cuantificando y clasificando el tamaño de la zona de inhibición. Si bien este tipo de *screening* es bastante barato, es difícil utilizarlo como *screening* de alto rendimiento, dado que la medición de la zona de inhibición en las cajas de Petri debe hacerse manualmente. Sin embargo, Shehata, Lyons, Jordan y Raizada (2016) lograron analizar las actividades antifúngicas de una colección de cultivo bacteriano que constaba de 190 endófitos aislados de plantas del género *Zea* con dos patógenos vegetales objetivo. En esta investigación se encontró que cinco cepas eran activas contra *Sclerotinia homoeocarpa* y *Rhizoctonia solani*. Varios reportes sugieren que la correlación entre los ensayos *in vitro* y las actividades *in planta* es baja (Fravel, 2005; Haas & Keel, 2003; Renwick, Campbell, & Coe, 1991), aunque Shehata et al. (2016) encontraron que tres y cuatro cepas, respectivamente, retenían sus actividades de control biológico cuando se probaron en pasturas contra *Sclerotinia homoeocarpa* y *Rhizoctonia solani*.

En un ensayo de alto rendimiento, Bosmans et al. (2017) evaluaron la actividad biocontroladora de

aproximadamente 150 aislamientos bacterianos contra 35 cepas del patógeno bacteriano *Agrabacterium* biovar 1, causante de la enfermedad de la raíz peluda del tomate. Este enfoque de *screening* utilizó un sistema robótico de recogida de colonias en un ensayo de superposición en agar. En esta configuración, los microorganismos de la colección se cultivaron en microplacas de 96 pozos. El robot de recogida de colonias se equipó con un cabezal de 96 alfileres y se usó para transferir los cultivos microbianos desde las microplacas a placas planas OmniTray para dejar crecer los microorganismos durante la noche (figura 20.3). Al día siguiente, se usó un medio de cultivo sólido previamente inoculado con el patógeno *Agrobacterium* biovar 1 para superponer en él las colonias de los potenciales biocontroladores. Después de la incubación de las placas coinoculadas superpuestas, se cuantificó la actividad antagonista, presumiblemente debida a metabolitos difusibles, midiendo manualmente el tamaño de las zonas de inhibición. De las 150 cepas bacterianas de diversos géneros ensayados, se identificaron siete cepas de *Paenibacillus* estrechamente relacionadas con la actividad biocontroladora. El análisis detallado reveló que algunas de esas siete especies mostraron actividad contra las 35 cepas del patógeno *Agrobacterium* biovar 1, mientras que otras fueron activas solo contra algunas de estas.

El sistema de *screening* anterior, aunque fue usado para un número de microorganismos relativamente pequeño, tiene el potencial de analizar la actividad biocontroladora de una gran colección de microorganismos. Dada la escasez de reactivos y del personal requerido, este ensayo podría modificarse fácilmente para detectar varios miles de aislamientos microbianos en cuestión de meses. Sin embargo, una de las limitantes de este sistema es la medición manual de las zonas de inhibición. Esta es una cuestión persistente si se buscan actividades contra patógenos fúngicos o bacterianos. Sin embargo, con un enfoque creativo para el desarrollo del ensayo, se pueden identificar alternativas. Por ejemplo, Figueroa-López, Cordero-Ramírez, Quiroz-Figueroa y Maldonado-Mendoza (2014) desarrollaron un ensayo de antagonismo líquido en microplacas de 96 pozos que permitió analizar la actividad biocontroladora de una colección bacteriana de 11.520 aislamientos contra el patógeno del maíz *Fusarium verticillioides* (Figueroa-López et al., 2016). En este caso, la biomasa fúngica

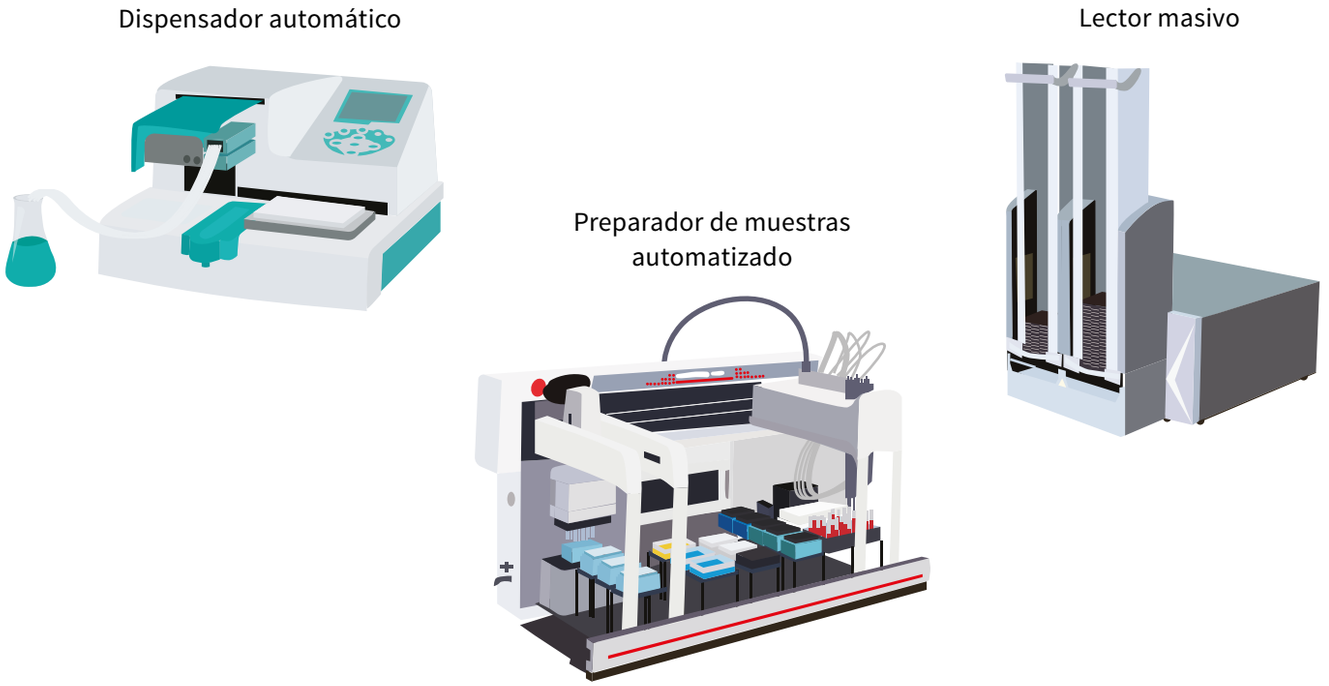


Figura 20.3. Equipos comúnmente utilizados en *screening* de alta eficiencia.

Fuente: Elaboración propia

se cuantificó por tinción de los residuos de quitina de la pared celular de hongos usando una lectina de aglutinina de germen de trigo acoplada a un fluoróforo (conjugado WGA Alexa Fluor 488). El poder de este análisis se basa en la cuantificación automatizada de los resultados experimentales, que se hace mediante un lector de placas con capacidad de detección de fluorescencia para determinar la biomasa de los hongos. Para identificar los agentes de control biológico bacteriano, los autores de estos informes establecieron arbitrariamente como criterio de selección aquellas bacterias capaces de inhibir mínimo en un 50 % el crecimiento de los hongos; así, mediante este nivel de rigurosidad, identificaron 622 cepas bacterianas candidatas con alta actividad antimicótica. Aunque este número sigue siendo alto, redujo en gran medida el número de aislamientos iniciales, lo que permite una búsqueda más precisa de rasgos deseables adicionales, como la actividad *in planta*, la colonización de plantas, la movilización de nutrientes, la tolerancia a la desecación y a la reconstitución y la facilidad de fermentación y de formulación.

Screening al nivel de bioactividad

En la sección anterior, los ejemplos presentados estaban enfocados en las actividades de biocontrol con modos de acción indefinidos, centrados en una lectura relacionada con el crecimiento microbiano, o, más bien, en el antagonismo del crecimiento microbiano. Sin embargo, se han documentado varios modos de acción definidos en el control biológico de fitopatógenos, por lo que algunos laboratorios centran sus paradigmas de *screening* en modos de acción específicos. Una actividad de este tipo es la producción de sideróforos, que son compuestos quelantes de iones férricos de alto peso molecular y de alta afinidad que son producidos por bacterias y hongos que eliminan el hierro del medioambiente (Neilands, 1995). Como el hierro es, a menudo, una limitante, su captura se asocia con el control biológico porque los sideróforos reducen su disponibilidad para los fitopatógenos (Beneduzi, Ambrosini, & Passaglia, 2012; Kloepper, Leong, Teintze, & Schroth, 1980). Esto se ha demostrado en muchos ejemplos, como en el caso de los sideróforos producidos por *Bacillus subtilis* que ejercen un papel significativo en el control biológico de *Fusarium oxysporum*, causante del marchitamiento de pimiento (Yu, Ai, Xin, & Zhou, 2011). En el desarrollo de un *screening* de alto rendimiento para la actividad de sideróforos, Marques, Walshe, Doyle, Fernandes y De Carvalho (2012) adaptaron un ensayo que utiliza el reactivo indicador cromo azurol S, que se compacta firmemente con el hierro férrico y adquiere un color azul. Los sideróforos, debido a su mayor afinidad por el hierro férrico, eliminan competitivamente el sustrato férrico del complejo indicador y provocan un cambio de color, de azul a naranja. Estos autores realizaron la evaluación de aproximadamente 500 microorganismos en microplacas y usaron un analizador de imágenes para evaluar el cambio de color y determinar la capacidad de producción de sideróforos. En última instancia, se identificaron 11 cepas bacterianas con altos niveles de producción de sideróforos, que además fueron capaces de mantener sus niveles al ser producidas en fermentadores agitados de cinco litros.

Otra actividad utilizada en los procedimientos de *screening* de alta eficiencia se centra en la detección del *quorum sensing*, que es un sistema de señalización célula a célula encontrado en algunos patógenos que utilizan moléculas difusibles pequeñas, como la N-acil-homoserina lactona, como medio para detectar su propia densidad de población y sincronizar la expresión de los genes de virulencia (Chen, Gao, Chen, Yu, & Li, 2013). Algunos agentes biocontroladores interfieren con los sistemas de detección de *quorum sensing* de los patógenos mediante una actividad denominada *quorum quenching*. Por ejemplo, *Bacillus* sp. 240B codifica para una lactonasa que puede inactivar la N-acil-homoserina lactona y atenúa la señalización del *quorum sensing* en *Pectobacterium caratovorum*, el agente causante de la pudrición blanda de la papa (Dong, Xu, Li, & Zhang, 2000). Para identificar microorganismos biocontroladores con actividades de *quorum quenching*, Tang et al. (2013) desarrollaron un sistema de alto rendimiento con microplacas de 96 pozos y leyeron el ensayo con el biosensor *Agrobacterium tumefaciens* A136. Esta cepa bacteriana fue diseñada para detectar una amplia gama de N-acil-homoserina lactonas a través de un sistema transgénico que enlaza un factor de transcripción sensible a la N-acil-homoserina lactona con la expresión del reportero lacZ (que genera un color azul en presencia de X-gal). Para identificar microorganismos con actividad *quorum*

quenching lactonasa, se evaluaron aproximadamente 350 aislamientos microbianos que se cultivaron en presencia de N-acil-homoserina lactona y se incubaron durante 24 horas. Los sobrenadantes de cultivo se transfirieron a placas de microtitulación que contenían el biosensor A136 de *A. tumefaciens* y la solución de ensayo X-gal durante 12 horas. En los pozos control y en los pozos experimentales sin actividad de *quorum quenching* se produjo un color azul por la expresión de X-gal en el biosensor. Sin embargo, en los pozos del control positivo y en aquellos en los que los potenciales biocontroladores presentaron actividad de *quorum quenching*, la N-acil-homoserina lactona desactivada redujo o eliminó la expresión de X-gal. Los resultados se cuantificaron utilizando un lector de placas espectrofotométricas, y, de las 366 cepas bacterianas evaluadas, se encontró que 25 de ellas, pertenecientes a 14 especies, tuvieron actividad *quorum quenching*.

Consideraciones finales

Las técnicas de aislamiento de microorganismos han permitido obtener suficiente diversidad biológica, tanto que podría durar, aparentemente, toda la vida si se tiene en cuenta que varios tipos de suelos tienen poblaciones bacterianas del orden de 10^6 a 10^9 células por gramo (Whitman, Coleman, & Wiebe, 1998). Las tendencias recientes han mostrado que muchos laboratorios académicos, gubernamentales e industriales se han enfocado en la identificación de diversas actividades microbianas para usos agrícolas. Sin embargo, a menudo muchos rasgos microbianos identificados en el laboratorio no cumplen con las expectativas sobre su efecto en el campo. Idealmente, un primer enfoque de *screening* en campo ayudaría a eliminar estas preocupaciones, pero el costo de estas evaluaciones sería prohibitivo. Por lo tanto, muchos grupos de investigación han tratado de hacer confluir estas dos realidades mediante análisis iniciales de grandes colecciones microbianas para aumentar el número de candidatos de alta calidad, que puedan ser evaluados en pruebas de campo.

Al final, el número de microorganismos identificados, idealmente con múltiples rasgos benéficos para la agricultura, se reduciría a unos pocos. Si se analizan suficientes aislamientos microbianos, se incrementan las posibilidades de encontrar cepas adaptadas a las condiciones medioambientales en las que serían aplicadas, versátiles, fácilmente fermentables y formulables y altamente efectivas para el control de las enfermedades para las cuales se busca una solución.

Es evidente que la automatización del laboratorio aumentará el nivel de rendimiento de cualquier sistema de *screening*, pero también aumentará los costos asociados a la compra del equipo, los consumibles y el mantenimiento. Además, la detección de un número tan elevado de microorganismos crea sus propios problemas, particularmente en términos de manejo de los datos obtenidos. La caracterización de decenas o cientos de miles de microorganismos con ensayos múltiples puede sumarse muy rápido y generar millones de datos para administrar. Los sistemas de información son ideales para almacenar y consultar grandes volúmenes de datos, pero requieren de personal especializado para establecer las bases de datos y para mantenerlas adecuadamente. Los analistas deben tener experiencia en estadística para entender los datos generados, seleccionar los mejores candidatos y correlacionar las actividades de laboratorio con los éxitos en campo.

Control biológico de virus de plantas

Es bien conocido que las rizobacterias que promueven el crecimiento vegetal (PGPR) y los endófitos son herramientas usadas para el control de enfermedades fúngicas y bacterianas en las plantas, pero también son capaces de controlar algunos de sus virus. Bacterias como *Pseudomonas fluorescens* (PGPR, cepa 89B-27) y *Serratia marcescens* (endófito, cepa 90-166) indujeron resistencia sistémica en el pepino contra algunas enfermedades fúngicas y bacterianas. Además, aplicadas en las semillas, mostraron capacidad para proteger las plantas de pepino del desarrollo de la enfermedad *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Raupach, Liu, Murphy, Tuzun, & Kloepper, 1996).

Igualmente, plantas de banano tratadas con bioformulaciones en mezcla de la rizobacteria *Pseudomonas fluorescens* (Pf1) y la cepa endófita *Bacillus* sp. (EPB22) fueron eficaces en la reducción de la incidencia de *Banana bunchy top virus* (BBTV) bajo condiciones de invernadero (80 %) y en campo (52 %) (Harish, Kavino, Kumar, Balasubramanian, & Samiyappan, 2009). El hongo endófito en raíz *Piriformospora indica*, con propiedades de promover el crecimiento vegetal en muchas especies vegetales y de inducir resistencia contra patógenos de raíces y brotes en cebada, trigo y *Arabidopsis*, influyó en la reducción de la concentración del *Pepino mosaic virus* (PepMV) en tomates (Fakhro et al., 2010).

Hasta el momento, microorganismos como las PGPR y los endófitos aún no han sido registrados para el control de virus porque no se han evaluado ampliamente en campo para el control de estos patógenos. Sin embargo, parecen tener un amplio espectro de control de enfermedades virales. Por lo tanto, en un futuro se esperarían más estudios al respecto.

Una estrategia interesante en esta área es el uso de un endófito para el control del vector de la enfermedad viral más importante de la lechuga, conocida como *vena ancha*, causada por *Mirafiori lettuce big-vein virus* (MLBVV). Su vector es el hongo oomicete *Olpidium virulentus*, habitante del suelo y parásito obligado de raíces; sin embargo, su control químico es difícil (Iwamoto, Aino, Kanto, & Maekawa, 2003). Aino, Iwamoto, Hashimoto e Ishikawa (2007) aislaron cientos de endófitos de raíces de plantas del género *Brassica* y de lechuga, evaluaron su actividad de inhibición de las zoosporas en raíces de lechuga y encontraron que algunos aislamientos de *Pseudomonas fluorescens* bloquearon la infestación de zoosporas. Bajo una severa infestación, estos endófitos lograron un control adecuado de la enfermedad y el 100 % de la lechuga cosechada fue apta por tamaño y calidad para su venta comercial. Como el tratamiento con *P. fluorescens* en campo aumentó los costos y las labores por mano de obra, se desarrolló una nueva tecnología de revestimiento de semillas: en primer lugar, se inoculó el endófito entre la semilla de lechuga y su testa usando presión reducida. Las semillas inoculadas se secaron a baja temperatura y se formularon como *semillas recubiertas* o *peletizadas*. Las semillas tratadas con *P. fluorescens* fueron 100 % activas durante tres meses a 4 °C (Aino et al., 2007).

Control biológico de bacterias fitopatógenas con fagos

El manejo de bacterias fitopatógenas se hace principalmente mediante el uso de antibióticos (tetraciclina y estreptomicina) y cobre. Este último se ha usado por más de cien años y los antibióticos, como la estreptomicina, se han utilizado desde 1950 (Cooksey, 1990; McManus, Stockwell, Sundin, & Jones, 2002). La estreptomicina se ha utilizado para el control de varias bacterias, incluyendo especies de *Pseudomonas* tales como *Pseudomonas syringae*, y especies de *Xanthomonas*, tales como *Xanthomonas vesicatoria*, entre otras; la resistencia a este antibiótico ha sido reportada regularmente después de su uso (Cooksey, 1990; Dye, 1953; Thayer & Stall, 1961). Otra preocupación respecto al uso de antibióticos es la propagación de genes de resistencia a otras bacterias, incluyendo bacterias no patógenas o patógenas presentes en el medioambiente (McManus et al., 2002). La resistencia al cobre también se ha documentado para las bacterias fitopatógenas (Behlau, Canteros, Minsavage, Jones, & Graham, 2011; Bender & Cooksey, 1986; Cooksey, 1994; Lee, Hendson, Panopoulos, & Schroth, 1994). Además, su aplicación continua puede conducir a niveles tóxicos de este compuesto en el medioambiente (Hirst, Le Riche, & Bascomb, 1961; Pietrzak & McPhail, 2004).

Existe un creciente interés en el uso de bacteriófagos (fagos) como agentes de control biológico (*biological control agents* [BCA, por la sigla en inglés]). Los fagos son virus que infectan específicamente bacterias, pero no tienen efectos negativos directos sobre animales o plantas. La infección de una bacteria por un fago virulento se produce como resultado de su rápida replicación viral, seguida por la lisis de la bacteria y la liberación de numerosos fagos de progenie (figura 20.4).

Los fagos tienen gran importancia desde una perspectiva ecológica, dada la modulación que ejercen sobre poblaciones microbianas, lo cual impacta

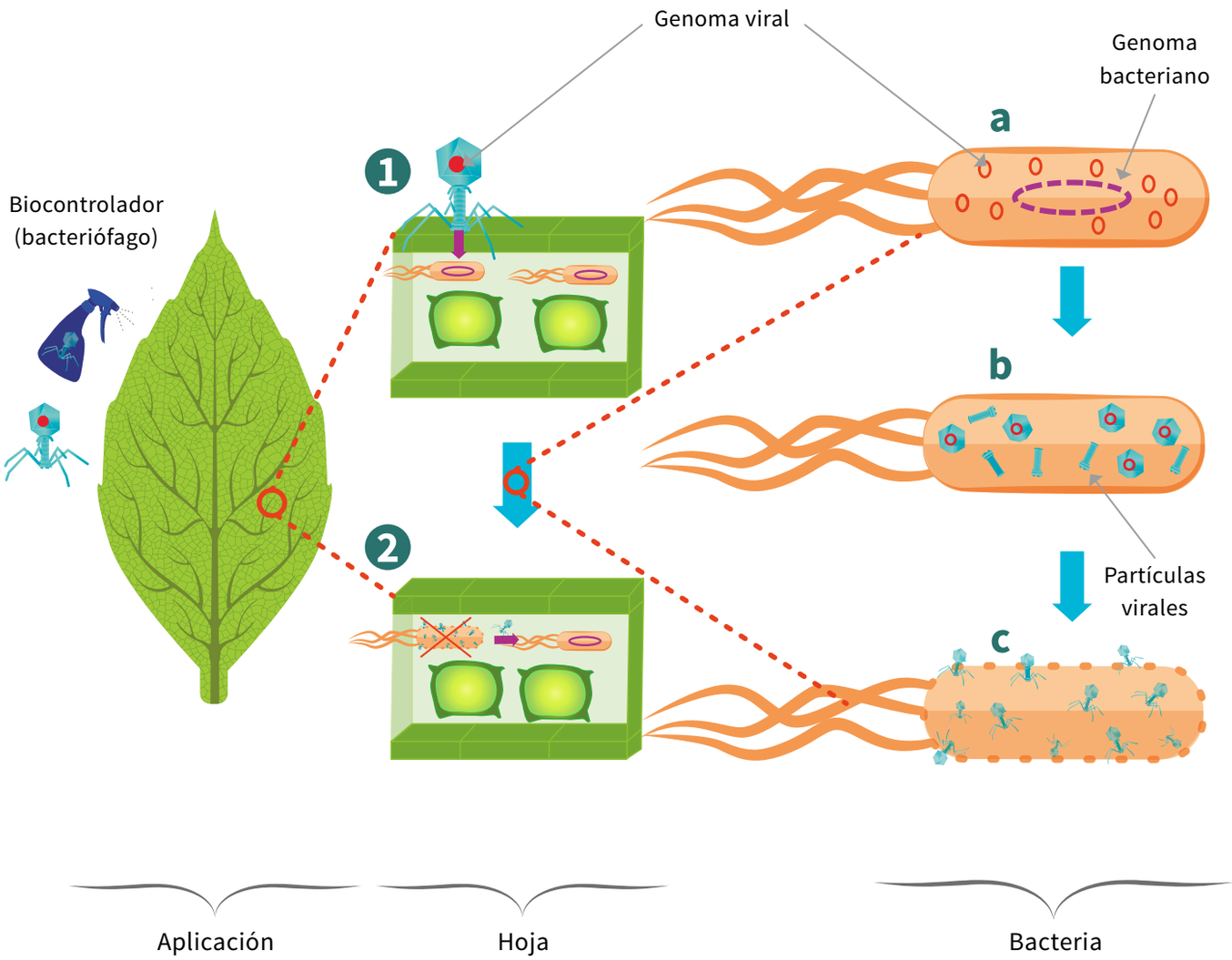


Figura 20.4. Control biológico de bacterias fitopatógenas con fagos. Ciclo de vida: 1. Infección del bacteriófago e inserción del genoma viral en la bacteria; a. Inserción del genoma viral en la bacteria y degradación del genoma bacteriano; b. Replicación del genoma viral y síntesis de proteínas virales; c. Ensamblamiento y liberación; 2. Liberación de nuevos bacteriófagos y muerte de la célula bacteriana.

Fuente: Elaboración propia

procesos críticos en ecosistemas oceánicos, edáficos y animales (Krishnamurthy, Janowski, Zhao, Barouch, & Wang, 2016). Además, por su enorme diversidad, son considerados como "la entidad biológica predominante en el planeta" (traducción propia) (Grose & Casjens, 2014).

El descubrimiento de los bacteriófagos realizado por Twort (1915) y por Moore (1926) a principios del siglo xx abrió las puertas para su uso en el control de bacterias fitopatógenas (D'Herelle, 1911). Los pioneros Mallmann y Hemstreet (1924) observaron que los filtrados del líquido recogido de repollo en descomposición impidieron el crecimiento de la bacteria causante de dicha pudrición, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Estos autores y Moore (1926) encontraron que la sustancia inhibidora o "agente invisible represor de bacterias en cultivo"

solo se obtenía de filtrados de plantas enfermas de repollo y tabaco respectivamente. En 1925, Coons y Kotila demostraron que los bacteriófagos aislados del suelo suprimieron el crecimiento de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, el agente causal de la enfermedad de la pata negra de la papa. Adicionalmente, aislaron fagos activos contra *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Agrobacterium tumefaciens* de diferentes fuentes ambientales, como agua de río y suelo (Coons & Kotila, 1925).

Thomas (1935) condujo los primeros ensayos exitosos en campo, mediante el tratamiento de semillas con fagos, contra *Pantoea stewartii* en cultivos de maíz. Casi medio siglo después, Civerolo y Keil (1969) usaron exitosamente varios tratamientos con fagos foliares para el control de *Xanthomonas pruni* en las plántulas de durazno.

Los fagos tienen ciertos atributos, tales como la actividad biológica que pueden ejercer en dilución (10^{-11}), sus propiedades antigénicas, la resistencia ante agentes físicos y químicos que se sitúa entre formas vegetativas y esporulantes de bacterias y una amplia diversidad que contradice la unicidad planteada por D'Herelle (Katznelson, 1937). Sin embargo, a pesar de los resultados promisorios, Okabe y Goto (1963) concluyeron que los fagos, en general, no son muy promisorios como estrategia de control de las enfermedades bacterianas debido a la posibilidad de que las bacterias muten y adquieran resistencia a dichos bacteriófagos.

En relación con esto, algunas cepas o especies bacterianas permanecen susceptibles a la acción de los fagos, mientras que otras desarrollan resistencia. Las primeras fueron denominadas *homogéneas*, mientras que a las que adquieren resistencia se les llamó *heterogéneas*, con el agravante de que las heterogéneas pueden aumentar su virulencia (Katznelson, 1937; Okabe & Goto, 1963). En paralelo con observaciones en humanos y en animales, Katznelson (1937) anticipó que pueden existir bacterias fitopatógenas heterogéneas cuyos fluidos inhiben la actividad de los fagos, o que estos pueden ser adsorbidos por células y tejidos.

Existen varios retos para mejorar las interacciones fago-bacteria: su limitado espectro de actividad contra especies bacterianas específicas (Summers, 2005); la accesibilidad a la bacteria objetivo; el tiempo de aplicación del fago para optimizar su eficacia; la capacidad del fago para infectar y replicarse en el entorno de destino; la densidad de los fagos en el sitio de interacción (filósfera o rizosfera); las tasas de degradación del virión (el fago varía en las propiedades de degradación) y la humedad adecuada para promover la difusión de los fagos (Gill & Abedon, 2003), ya que es necesario que existan altas poblaciones de fagos en tiempos críticos para asegurar la interacción con la bacteria objetivo. Esto, frecuentemente, no es posible debido a su alta susceptibilidad a las condiciones medioambientales, tales como los rayos UVA y UVB, la temperatura ambiente, la desecación y los plaguicidas químicos, como los bactericidas a base de cobre, que son comúnmente utilizados para el tratamiento de enfermedades bacterianas. La radiación solar es el factor más limitante para la sobrevivencia de los fagos (Iriarte et al., 2007).

Dado que las enfermedades producidas en las plantas a causa de las bacterias siguen siendo muy limitantes, se ha observado un resurgimiento de los estudios sobre la profilaxis y el tratamiento de fitopatógenos con fagos. Sin embargo, aunque se han estudiado múltiples sistemas en los que se han usado fagos y existen resultados promisorios (tabla 20.1), hay muy pocos bioplaguicidas disponibles a nivel comercial. Por lo tanto, para hacer un uso efectivo de los fagos se deben diseñar estrategias que permitan hacer frente a sus limitantes, como es el caso de ciertas formulaciones protectoras para prolongar su persistencia y su actividad en el campo.

Otra estrategia empleada para mantener altas poblaciones ha sido usar, como vectores, cepas bacterianas no patógenas o atenuadas que sean sensibles a los fagos y que permitan su liberación y propagación. De otra parte, la selección de fagos tolerantes a las condiciones ambientales deletéreas podría permitir que se escojan organismos adaptados a los sitios en los que serían aplicados. Adicionalmente, el uso efectivo de los fagos en campo requiere del monitoreo permanente de las cepas bacterianas patógenas para minimizar el desarrollo de cepas resistentes o la proliferación de cepas silvestres que no sean sensibles a los bacteriófagos que se utilizan.

Tabla 20.1. Ejemplos de fagos usados para el control biológico de bacterias fitopatógenas

Patógeno	Hospedante	Enfermedad	
Agrobacterium tumefaciens	Tomate	Agalla de la corona	El bioensayo con bacteriófago de tejido infectado no tuvo efecto.
Dickeya solani	Papa	Podredumbre blanda	Se vio un pequeño efecto cuando el tubérculo semilla fue tratado con fago antes de la siembra.
Erwinia amylovora	Frutas de pepita	Tizón de fuego	Fagos aislados y caracterizados *in vitro*. Algunos ensayos *in planta*, con resultados prometedores en combinación con el vector no patógeno de *Pantoea agglomerans*.
Pectobacterium carotovorum subsp. *caratovorum*	Cartucho o alcatraz	Pudrición blanda bacteriana	Hubo reducción de la carga bacteriana por fagos, pero la inhibición de la muerte fue causada por soluciones fertilizantes.
Ralstonia solanacearum	Tabaco	Marchitez bacteriana	En pruebas en invernadero, el pretratamiento de las raíces con una cepa avirulenta y la aplicación de fagos protegieron a las plantas contra el marchitamiento bacteriano. No se realizó ninguna comparación con los métodos convencionales de control químico.
Ralstonia solanacearum	Tomate	Marchitez bacteriana	En un ensayo en invernadero, el pretratamiento de las plántulas de tomate con ϕRSL1 evitó el marchitamiento bacteriano en todas las plantas; todas las plantas no tratadas se marchitaron. ϕRSL1 inhibió el crecimiento de bacterias, pero no las eliminó completamente.
Streptomyces scabies	Papa	Sarna de la papa	El tratamiento con fago en los tubérculos antes de la siembra redujo la cobertura de la lesión de la costra.
Xanthomonas arborícola pv. *pruni*	Frutas de hueso	Puntos bacterianos	La aplicación de fago a las hojas de melocotón antes de la infección resultó en una reducción de la enfermedad del 42 % en comparación con un control no tratado. La aplicación de fago después de la infección no tuvo ningún efecto.
Xanthomonas axonopodis pv. *allii*	Cebolla	Tizón de la hoja por *Xanthomonas*	Los ensayos en campo e invernadero con el fago proporcionaron protección equivalente a la obtenida con cobre.
Xanthomonas axonopodis pv. *vignaeradiatae*	Frijol mungo	Mancha bacteriana de la hoja	El efecto sinérgico del fago y de la estreptomicina sobre las semillas de frijol mungo redujo la infección en las plántulas.

(Continúa)

(Continuación tabla 20.1)

Patógeno	Hospedante	Enfermedad	
Xanthomonas campestris pv. *juglandis*	Nogal	Tizón de nogal	En un ensayo de invernadero, el fago no sobrevivió en las hojas de nuez; el patógeno no fue incluido en las hojas.
Xanthomonas campestris pv. *pruni*	Melocotón	Manchas de hoja y fruto	En uno de cada tres huertos, se observó una reducción significativa de la enfermedad con la aplicación semanal de un solo fago.
Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria*	Tomate y pimiento	Manchas bacterianas	Estos estudios han conducido al desarrollo exitoso de un fago BCA (Omnilytics, 2018).
Xanthomonas citri subsp. *citri*	Cítricos	Cáncer de los cítricos	Resultados mixtos en ensayos en invernaderos y viveros comparados con bactericidas de cobre.
Xanthomonas fuscans subsp. *citrumelonis*	Cítricos	Mancha bacteriana de los cítricos	Resultados mixtos en ensayos en invernaderos y viveros comparados con bactericidas de cobre.

Fuente: Adaptado de Frampton, Pitman y Fineran (2012)

Endófitos

Los endófitos pueden ser hongos, bacterias y actinomicetos que pasan todo o un periodo de su ciclo de vida colonizando los espacios simplásicos o apoplásicos de los tejidos vegetales asintomáticos vivos (Wilson, 1995). Pueden desempeñar muchos papeles beneficiosos importantes en el metabolismo y en la fisiología de la planta huésped, incluyendo la fijación de nitrógeno atmosférico (Dalton et al., 2004), la solubilización de fosfatos (Forchetti, Masciarelli, Alemano, Alvarez, & Abdala, 2007), la síntesis de hormonas de crecimiento (Hardoim, Van Overbeek, & Elsas, 2008), la degradación de compuestos tóxicos (Sheng, Chen, & He, 2008), la inhibición de hongos patógenos, de patógenos bacterianos (Van Buren, Andre, & Ishimaru, 1993) y de insectos plaga (Castillo & Sword, 2015; Vega et al., 2009).

Muchos endófitos están representados por las bacterias comunes del suelo (actinomicetes, *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Bacillus*), las cuales producen una gama diversa de metabolitos secundarios, antibióticos y compuestos orgánicos volátiles para contrarrestar los efectos deletéreos de los patógenos. Además, los endófitos pueden contrarrestar los efectos adversos causados por estrés abiótico, como la salinidad (Ezra et al., 2004; Kloepper et al., 1999; Lodewyckx et al., 2002).

Es bien conocido que existe una gran diversidad biológica de hongos endofíticos y que tienen presencia desde las regiones templadas hasta las selvas tropicales, donde se distribuyen aproximadamente 300.000 especies de plantas hospedantes terrestres. Se sabe, además, que cada especie vegetal alberga una o más especies de hongos endofíticos que pueden desarrollarse asintomáticamente en diferentes tejidos sanos de plantas, incluyendo los tallos, las hojas y las raíces, y en el suelo. Se estima que hay más de un millón de especies de hongos endofíticos en la naturaleza (Faeth & Fagan, 2002), entre los cuales se encuentran las micorrizas

y los biocontroladores, tanto de enfermedades (es el caso de *Trichoderma* spp.) (Hosseyni-Moghaddam & Soltani, 2014; Mulaw, Druzhinina, Kubicek, & Atanasova, 2013) como de insectos plaga (es el caso de *Beauveria* y *Purpureocillium*) (Castillo & Sword, 2015).

Si se tiene en cuenta que la mayoría de microorganismos biocontroladores son muy sensibles a las condiciones medioambientales y que los tejidos internos de las plantas les proporcionan un ambiente protector a los endófitos, que colonizan un nicho ecológico similar a los patógenos de las plantas (Hallmann, Quadt-Hallmann, Mahaffee, & Kloepper, 1997), el uso de estas bacterias y de hongos endófitos biocontroladores podría garantizar una respuesta de control consistente. En el capítulo 19 de este libro, "Los hongos endófitos en control biológico de fitopatógenos e insectos plagas", se amplía este tema.

Bioestimulantes para mejorar la actividad de los microorganismos biocontroladores

En la literatura científica, el término *bioestimulante* fue definido por primera vez por Kauffman, Kneivel y Watschke (2007), y se refiere a los "materiales diferentes de los fertilizantes, que promueven el crecimiento de las plantas cuando se aplican en bajas cantidades" (traducción propia). Según Du Jardin (2015), un bioestimulante vegetal es cualquier sustancia o microorganismo aplicado a las plantas con el objetivo de mejorar la eficiencia nutricional, la tolerancia al estrés abiótico o los rasgos de calidad de los cultivos, independientemente de su contenido de nutrientes. Por extensión, los bioestimulantes de plantas también designan productos comerciales que contienen mezclas de tales sustancias o microorganismos. Muchos bioestimulantes mejoran la nutrición, y lo hacen independientemente de su contenido de nutrientes. Los biofertilizantes, que se proponen como una subcategoría de los bioestimulantes, aumentan la eficiencia en el uso de nutrientes. En este sentido, los bioestimulantes microbianos incluyen hongos micorrízicos y no micorrízicos, endosimbiontes bacterianos (como *Rhizobium*), bacterias biofertilizantes no simbióticas y rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas, a las cuales ya nos referimos. Por lo tanto, los microorganismos aplicados a las plantas pueden tener una doble función: como bioestimulantes y como agentes de biocontrol.

A continuación se mencionan algunos bioestimulantes definidos como sustancias beneficiosas para las plantas sin que sean nutrientes, plaguicidas o mejoradores del suelo.

Ácidos húmicos y fúlvicos

Los ácidos húmicos y fúlvicos (*humic substances* [HS, por la sigla en inglés]) son constituyentes naturales de la materia orgánica del suelo que resultan de la descomposición de residuos vegetales, animales y microbianos, pero también de la actividad metabólica de los microorganismos del suelo que utilizan estos sustratos. Son compuestos heterogéneos que originalmente fueron clasificados de acuerdo con sus pesos moleculares y su solubilidad como huminas, ácidos húmicos y ácidos fúlvicos. Estos compuestos tienen una dinámica compleja de asociación y disociación en coloides supramoleculares que también es influenciada por las raíces de las plantas mediante la liberación de protones y exudados. Las sustancias húmicas y sus complejos en el suelo resultan de la interacción entre la materia orgánica, los microorganismos y las raíces de las plantas. La variabilidad de los efectos de los HS está relacionada con la fuente de la que son obtenidos, las condiciones ambientales, la planta receptora, la dosis y la forma de aplicación (Rose et al., 2014).

Hidrolizados de proteínas y otros compuestos que contienen nitrógeno

Las mezclas de aminoácidos y péptidos se obtienen por hidrólisis química y enzimática de proteínas a

partir de subproductos agroindustriales, tanto de origen vegetal (residuos de cosecha) como de desechos animales (por ejemplo, colágeno y tejidos epiteliales) (Calvo, Nelson, & Kloepper, 2014; Du Jardin, 2012; Halpern et al., 2015). Otras moléculas nitrogenadas incluyen betaínas, poliaminas y aminoácidos no proteínicos, que son heterogéneos y diversificados, pero poco caracterizados con respecto a sus roles fisiológicos y ecológicos (Vranova, Rejsek, Skene, & Formanek, 2011). La trimetilglicina, conocida como betaína, es un caso especial derivado de aminoácidos, ya que este compuesto posee propiedades antiestrés bien conocidas para las plantas (Chen & Murata, 2011).

Los bioestimulantes desempeñan múltiples funciones, ya que pueden actuar como promotores del crecimiento de las plantas (Calvo et al., 2014; Du Jardin, 2012; Halpern et al., 2015). Otros efectos directos en las plantas incluyen la modulación de la absorción y asimilación de N mediante la regulación de las enzimas involucradas en la asimilación de N y de sus genes estructurales, que actúan sobre la vía de señalización de adquisición de N por las raíces. Al regular las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (*tricarboxylic acid* [TCA por su sigla en inglés]) también contribuyen a la conversación cruzada entre los metabolismos del carbono y del nitrógeno. A los hidrolizados de proteínas también se les han atribuido actividades hormonales (Colla, Rouphael, Canaguier, Svecova, & Cardarelli, 2014). Algunos aminoácidos (como la prolina) poseen efectos quelantes que pueden proteger las plantas contra el efecto de los metales pesados y también contribuyen a la movilidad y la adquisición de micronutrientes. La betaína, la glicina y la prolina contribuyen a la mitigación del estrés ambiental, pues poseen actividad antioxidante.

Los efectos indirectos sobre la nutrición y el crecimiento de las plantas también son importantes en la práctica agrícola cuando se aplican hidrolizados de proteínas a las plantas y al suelo. Se sabe que los hidrolizados de proteínas aumentan la biomasa microbiana y su actividad, mejorando así la respiración y la fertilidad del suelo. Se considera que las actividades quelantes de algunos aminoácidos y péptidos contribuyen a la disponibilidad de nutrientes y a su toma por las raíces (Du Jardin, 2015).

Extractos de algas marinas y plantas

El uso de algas frescas como fuente de materia orgánica y como fertilizante es antiguo en la agricultura, pero sus efectos bioestimulantes se han reportado recientemente. Los polisacáridos, como laminarina, alginatos y carragenanos y sus productos de descomposición, así como los esteroles, las betaínas y las hormonas contribuyen a la promoción del crecimiento vegetal (Craigie, 2011; Khan et al., 2009). La mayoría de las especies de algas pertenecen a los géneros de las algas pardas, como *Ascophyllum*, *Fucus* y *Laminaria*, pero los carragenanos provienen de las algas rojas. Más de veinte productos de algas utilizadas como bioestimulantes para el crecimiento de las plantas han sido enumerados por Khan et al. (2009) y por Craigie (2011). Estos pueden aplicarse en suelos, en cultivos hidropónicos o en tratamientos foliares. En los suelos, sus polisacáridos contribuyen a la formación de gel, la retención de agua y la aireación. Los compuestos polianiónicos contribuyen a la fijación y el intercambio de cationes, lo que también es de interés para la fijación de metales pesados y para la remediación del suelo.

También se describen efectos positivos a través de la microflora del suelo, con la estimulación de bacterias promotoras del crecimiento y de microorganismos antagonistas de fitopatógenos en suelos supresivos. En las plantas, proveen micro y macronutrientes que actúan como fertilizantes. Las consecuencias sobre la germinación de las semillas, el establecimiento de las plantas y su crecimiento y desarrollo están asociadas con los efectos hormonales, que se consideran como los principales causantes de la actividad de bioestimulación. Aunque las citoquininas, auxinas, ácido abscísico, giberelinas y otros compuestos como los esteroles y las poliaminas han sido identificados en extractos de algas (Craigie, 2011), se ha demostrado que los efectos hormonales de los extractos del alga marrón *Ascophyllum nodosum* se explican, en gran medida, por la regulación positiva de los genes de la biosíntesis de las hormonas en los tejidos de las plantas y, en menor medida, por los contenidos hormonales de los extractos de algas marinas (Wally et al., 2013a, 2013b).

Quitina, quitosán y otros biopolímeros

La quitina es un polímero de N-acetil-D-glucosamina unido por enlace β(1,4) que tiene propiedades físico-químicas y biológicas de gran interés agrícola (Tharanathan & Kittur, 2003). Después de la celulosa, es el polisacárido más abundante en la naturaleza. Este biopolímero es el componente básico que les confiere resistencia mecánica a los organismos que la contienen, como es el caso de los insectos y los crustáceos, ya que constituye el principal componente del exoesqueleto. Además, forma parte de las paredes celulares de los hongos, las algas y los huevos de los nematodos (Cohen, 2001; De Jin et al., 2005; Gortari & Hours, 2008; Merzendorfer & Zimoch, 2003).

El quitosán es un polímero de β-1,4-glucosamina que hace parte esencial de la pared celular de los hongos y se puede obtener por desacetilación de la quitina presente en el exoesqueleto de artrópodos (Winterowd & Sandford, 1995). Este es el aminopolisacárido más abundante de origen natural, no es tóxico, es bioactivo y posee características fisicoquímicas especiales que están relacionadas con su actividad biológica (Goy, Britto, & Assis, 2009; Rabea, Badawy, Stevens, Smagghe, & Steurbaut, 2003).

Debido a que la quitina y el quitosán no se encuentran presentes en las plantas y los vertebrados, se pueden utilizar de manera segura en el control de insectos plaga y de enfermedades (Cohen, 2001). Ambos biopolímeros tienen propiedades en el control de enfermedades debido a diferentes mecanismos indirectos y directos; en el primer caso, pueden estimular el desarrollo de microflora benéfica que actúa como biocontroladora (Badawy & Rabea, 2011; Tian, Riggs, & Crippen, 2000). Además, estimulan las defensas de las plantas, ya que inducen la biosíntesis de fitoalexinas (Ren & West, 1992; Yamada, Shibuya, Kodama, & Akatsuka, 1993), la activación de glucanasas y quitinasas (Kaku, Shibuya, Xu, Aryan, & Fincher, 1997; Roby, Gadelle, & Toppan, 1987), la biosíntesis de ácido jasmónico (Nojiri et al., 1996), la generación de especies reactivas de oxígeno (Kuchitsu, Kosaka, Shiga, & Shibuya, 1995), la expresión temprana de respuesta de genes relacionados con la defensa (Minami et al., 1996; Nishizawa et al., 1999; Takai, Hasegawa, Kaku, Shibuya, & Minami, 2001), la lignificación (Barber, Bertram, & Ride, 1989), la despolarización de la membrana y fosforilación de proteínas, además de generar variaciones en el flujo de iones y acidificación citoplasmática (Barber et al., 1989; Felix, Baureithel, & Boller, 1998; Felix, Regenass, & Boller, 1993; Kikuyama, Kuchitsu, & Shibuya, 1997). Complementariamente, el quitosán inhibe la producción de proteinasas (Walker-Simmons & Ryan, 1984) e induce la formación calosa (Conrath, Domard, & Kauss, 1989; Köhle, Jeblick, Poten, Blaschek, & Kauss, 1985). El principal efecto directo de estos biopolímeros se centra en sus propiedades fungicidas o antimicrobiales (Badawy & Rabea, 2011; El Hadrami, Adam, El Hadrami, & Daayf, 2010; Goy et al., 2009; Rabea et al., 2003).

La adición de quitina o de quitosán como adyuvante para mejorar la eficacia de los microorganismos antagonistas y para inducir resistencia sistémica en la planta, ya sea solo o en combinación con agentes de control biológico, ha tenido éxito contra diversos patógenos del suelo y representa una alternativa viable para el manejo de enfermedades fúngicas (Benhamou, Kloepper, & Tuzun, 1998; El-Ghaouth, Arul, Ponnampalam, & Boulet, 1991; El-Ghaouth, Ponnampalam, Castaigne, & Arul, 1992). Su efecto sinérgico con agentes de control biológico fue demostrado por Algam et al. (2010) en la interacción *Paenibacillus polymyxa* – tomate – *Ralstonia solanacearum* y *Trichoderma harzianum* – tomate – *F. oxysporum*, en donde la concentración de quitosán de 0,5 a 4 $g.L^{-1}$ disminuyó significativamente el crecimiento del patógeno e inhibió totalmente a la concentración de 4 $g.L^{-1}$. En condiciones de invernadero, la aplicación de *T. harzianum* y quitosán (1 $g.L^{-1}$), como tratamiento de inmersión de la raíz, redujo la incidencia de la enfermedad en un 66,6 % (El-Mohamedy, Abdel-Kareem, Jaboun-Khiareddine, & Daami-Remadi, 2014). Estos compuestos se utilizan en la agricultura, en forma de polímeros y de oligómeros de tamaños variables.

Los efectos fisiológicos de los oligómeros del quitosán en las plantas son el resultado de la capacidad de este compuesto policatiónico de unirse a una amplia gama de componentes celulares, incluyendo el ADN, la membrana plasmática y los constituyentes de la pared celular,

además de unirse a receptores específicos implicados en la activación de los genes de defensa (El Hadrami et al., 2010; Hadwiger, 2013; Katiyar, Hemantaranjan, & Singh, 2015; Yin, Zhao, & Du, 2010). La quitina y el quitosán usan aparentemente distintos receptores y vías de señalización. Entre los efectos celulares de la unión del quitosán a los receptores celulares más o menos específicos, se ha demostrado la acumulación de peróxido de hidrógeno y la fuga de Ca^{2+} en la célula, lo que causa cambios fisiológicos, ya que estos tienen un rol clave en la señalización de las respuestas al estrés y en la regulación del desarrollo. El análisis del proteoma (Ferri, Franceschetti, Naldrett, Saalbach, & Tassoni, 2014) o del transcriptoma (Povero et al., 2011) de tejidos vegetales tratados con quitosán confirmaron esta suposición. Aunque el uso de este compuesto se ha centrado en la protección de las plantas contra los patógenos, sus usos agrícolas podrían ser más amplios, ya que le confieren a la planta tolerancia al estrés abiótico (sequía, salinidad y estrés por el frío). El cierre estomático inducido por el quitosán a través de un mecanismo dependiente del ácido abcísico (ABA) participa en la protección del estrés ambiental conferida por este bioestimulante (Iriti et al., 2009).

Otros polímeros y oligómeros de origen biológico se utilizan en la agricultura como elicitores, como en el caso de la laminarina, un glucano de almacenamiento de las algas marrones. Aunque debe hacerse una distinción entre el biocontrol y la bioestimulación, las vías de señalización pueden estar interconectadas y ambos efectos pueden, prácticamente, resultar de la aplicación de los mismos inductores (Gozzo & Faoro, 2013).

En conclusión, los bioestimulantes pueden ejercer múltiples funciones, ya que pueden mejorar la resistencia de las plantas a las perturbaciones ambientales al ejercer efectos directos sobre esta o sobre los microorganismos benéficos del suelo. Sin embargo, aún falta mucha investigación para definir las dosis, las técnicas de aplicación y las especificidades para producir mayor impacto en la protección contra el estrés. Además, debe darse una alta prioridad a la mejor comprensión de sus efectos funcionales y sus mecanismos, ya que solo así se podrá pasar a la próxima generación de bioestimulantes en la cual las sinergias y los mecanismos complementarios puedan ser diseñados funcionalmente. Se ha propuesto un enfoque integral y sistemático para descubrir y caracterizar los nuevos bioestimulantes y comprender su modo de acción, utilizando un enfoque combinado que abarque la biología, la química y las ómicas. Los metaanálisis podrían ayudar a encontrar nuevos efectos de los bioestimulantes y sus los factores sinérgicos y complementarios; así, se podrían desarrollar formulaciones específicas de agentes de control biológico con bioestimulantes dirigidas a mejorar la respuesta de la planta tanto al estrés biótico como abiótico. Por ejemplo, para mejorar la resiliencia de las plantas en condiciones de sequía, los bioestimulantes podrían estimular el crecimiento de las raíces y el desarrollo de brotes, lo que les permitiría explorar la capa de suelo más profunda durante la temporada de sequía y estimular la síntesis de solutos compatibles para restablecer gradientes potenciales y absorción de agua cuando esta disminuya en el suelo. Ciertos efectos positivos pueden ser producidos por los bioestimulantes microbianos, que crean superficies de absorción alrededor de los sistemas radicales y secuestran el agua del suelo para favorecer las plantas. Los bioestimulantes también podrían usarse simultáneamente para estabilizar o mejorar la actividad de los microorganismos biocontroladores y para estimular las respuestas de defensa de las plantas, mejorando así la salud vegetal; esto generaría una mayor tolerancia ante los diferentes fitopatógenos e insectos que amenazan a un cultivo determinado.

Aplicaciones del microbioma presente en distintos tejidos de la planta

Una de las observaciones interesantes derivada de los estudios de diversidad molecular es que los órganos en las plantas —por ejemplo, la rizosfera (raíces), la filósfera (zona aérea), la endósfera (tejidos internos) y la carpósfera (frutos)— están colonizados por microorganismos, y los distintos tejidos parecen favorecer el reclutamiento de comunidades microbianas variadas. Las comunidades bacterianas son abundantes

en los distintos tejidos de la planta: por ejemplo, se ha estimado que existen de 10^6 a 10^7 células/cm en la superficie de las hojas y de 10^6 a 10^9 células/g en la rizosfera (Whitman et al., 1998); estos ensamblajes de comunidades no son producto del azar y parecen estar determinados por la anatomía de las hojas y las raíces y por la producción de exudados en estos tejidos (Berg, Rybakova, Grube, & Koberl, 2016).

La rizosfera se caracteriza por su alta abundancia microbiana (Berg, Eberl, & Hartmann, 2005) y es, tal vez, uno de los ambientes más estudiados, en parte porque los microorganismos presentes en la raíz promueven un mejor aprovechamiento de los nutrientes y pueden proteger la salud de la planta y evitar el desarrollo de enfermedades. Una de las características interesantes de la rizosfera es su capacidad de reclutar del suelo especies microbianas específicas. Esta selección específica de microorganismos ha sido demostrada por medio de metodologías como el enriquecimiento isotópico (Haichar et al., 2008) y por la comparación por secuenciación de 16S rARN de las comunidades microbianas, que señalan que solo una fracción de la comunidad presente en el suelo es capaz de habitar las raíces (Bulgarelli et al., 2012; Lundberg et al., 2012). En la misma dirección, la localización espacial de los microorganismos en la raíz y su relación con la distribución de nutrientes ha sido demostrada por microscopía, por medio de metodologías como la FISH (Bulgarelli et al., 2012; Lundberg et al., 2012; Ofek, Hadar, & Minz, 2012). Esta colocalización de nutrientes señala que las asociaciones entre la raíz y los microorganismos se dan por comunicación química, y en esta se involucran la acumulación de mucílago, los metabolitos secundarios exudados con la capacidad de atraer o repeler microorganismos (Badri & Vivanco, 2009), e incluso los mecanismos de defensa (Doornbos, Van Loon, & Bakker, 2012).

Estos mecanismos de comunicación y reclutamiento del microbioma parecen ser especie-específicos, como se observó en estudios comparativos de la diversidad de la rizosfera de dos plantas medicinales cultivadas en suelos adyacentes con las mismas condiciones donde, a pesar de su proximidad, se encontró hasta un 30 % de diferencias en la diversidad microbiana asociada a la raíz, al igual que diferencias funcionales en los organismos colonizadores del tejido (Koberl, Schmidt, Ramadan, Bauer, & Berg, 2013). Adicional a la importancia para la planta, se sabe que las comunidades de microorganismos en la rizosfera también son importantes para los ecosistemas terrestres, ya que catalizan procesos como la fijación de carbono, la cual es fundamental para el funcionamiento y el ciclaje de los nutrientes (Berg, Grube, Schloter, & Smalla, 2014).

En comparación con la rizosfera, la abundancia microbiana en la filósfera es menor debido a que las hojas son un ambiente más dinámico, con un menor tiempo de vida que las raíces, un menor número de nutrientes y con una mayor exposición a cambios de humedad, radiación y temperatura (Vorholt, 2012). Las hojas tienen diferentes estrategias y estructuras que afectan la colonización microbiana, como las capas de cera y la producción de compuestos secundarios que tienen un efecto antimicrobiano (Berg et al., 2016). Tal vez por la presencia de estas estructuras, la escasez de recursos y la variabilidad de las condiciones, la colonización de las superficies de las hojas se da en grupos pequeños de agregados que se forman principalmente en las uniones de las células epidérmicas, a lo largo de las venas y en las bases de los tricomas (Lindow & Brandl, 2003).

La colonización y el establecimiento del microbioma de la filósfera están determinados por las condiciones ambientales y biológicas. Un estudio conducido durante el periodo de crecimiento (julio-agosto) de cultivos de frijol, soya y canola muestra que durante esta etapa las variables climatológicas de las estaciones influyen sobre la composición y la maduración del microbioma de la filósfera (Copeland, Yuan, Layeghifard, Wang, & Guttman, 2015). Al principio, la composición del microbioma se ve fuertemente influenciada por los microorganismos del suelo; sin embargo, a medida que transcurre la temporada, la comunidad se vuelve menos diversa y más específica, con presencia de microorganismos como los de la familia Methylobacteraceae que comúnmente se encuentran asociados a la filósfera. Otro estudio reciente, esta vez en 57 especies de árboles en bosques neotropicales, muestra la relación de la microbiota asociada a la filósfera con los atributos biológicos de los árboles (Kembel et al., 2014). En este caso se encontraron asociaciones entre la estructura del microbioma y variables como la fisiología de la planta, la relación evolutiva, la densidad de la madera, la densidad de la

hoja y las concentraciones de nitrógeno y fósforo en las hojas. Entre estos atributos, la concentración de nitrógeno y fósforo es la que parece tener un mayor efecto sobre el microbioma, debido, posiblemente, a que estos valores representan una medida de la estrategia de toma y retención de nutrientes por parte de la planta, lo cual se refleja en la estructura de las hojas y afecta la composición de la microbiota. Estos estudios muestran la complejidad de las fuerzas que modulan el establecimiento del microbioma de la filósfera y que tanto los factores bióticos como los abióticos deben ser evaluados en futuros estudios para dilucidar las fuerzas que determinan su composición y su dinámica.

Otra área de trabajo en la investigación de la microbiota se enfoca en el estudio de los frutos o la carpósfera. Debido a la relación directa con la producción agrícola, el estudio en este tema se ha venido desarrollando en varias direcciones, desde su interacción con insectos plaga hasta su estudio para evitar pérdidas asociadas a la infección por microorganismos que se desarrollan durante los procesos de poscosecha. Un estudio reciente en manzanas cosechadas evaluó la diversidad fúngica en distintas partes del fruto y su relación con las prácticas de manejo orgánico y convencional (Abdelfattah, Wisniewski, Droby, & Schena, 2016). Se evaluaron las frutas poco después de la compra (T1) y después de dos semanas de almacenamiento (T5). Los análisis de diversidad revelaron poblaciones significativamente diferentes en las manzanas orgánicas y en las convencionales, y este resultado fue consistente en todas las partes de la fruta que fueron analizadas (extremo del cáliz, cáscara, extremo del pedúnculo y carne herida). Los resultados de este estudio representan un avance de los conocimientos actuales sobre la microbiota de los hongos en los tejidos de la fruta y muestran la importancia del manejo para la diversidad final del microbioma del fruto. Incluso dan a conocer alternativas de estudio interesantes para el diseño de nuevas estrategias de control que modulen el establecimiento de un microbioma controlador de enfermedades poscosecha.

A pesar de la ubicuidad de los microbiomas asociados a los distintos tejidos y su posible rol en la salud de las plantas, la mayoría de los estudios sobre control biológico se han enfocado principalmente en el entendimiento de interacciones simples planta-patógeno y planta-patógeno-agente controlador. Aunque estas aproximaciones han permitido entender múltiples mecanismos de control de enfermedades y seleccionar microorganismos, el omitir la influencia del resto de la comunidad microbiana puede sesgar la aplicación óptima de estos bioproductos. Por ejemplo, una de las grandes limitantes de los biocontroladores es la baja reproducibilidad de los resultados cuando se aplican en distintos lugares. Varios autores sugieren que gran parte de esta variabilidad se debe precisamente a que no se conoce si la microbiota local de las plantas afecta de forma positiva o negativa la respuesta de los agentes biocontroladores (Massart, Martinez-Medina, & Jijakli, 2015). Entender el efecto del microbioma en la planta puede ayudar a impulsar el uso de agentes biológicos sobre compuestos químicos que muchas veces son nocivos para el medioambiente.

Se han propuesto varias aproximaciones que permitirían aprovechar el uso del conocimiento del microbioma en el área del control biológico. Una estrategia de prevención busca dilucidar si las interacciones microbiota-patógeno-planta, como la competencia por nutrientes y espacio, la antibiosis y la estimulación de la respuesta sistémica del hospedero, pueden suprimir la proliferación de patógenos (Berg et al., 2016). Por ejemplo, muchos patógenos bacterianos foliares colonizan las superficies de las plantas antes de la infección, y el tamaño de las poblaciones resultantes se correlaciona con la severidad de la enfermedad. Esto sugiere que un microbioma compuesto por poblaciones competidoras en la filósfera puede reducir el establecimiento y la colonización del patógeno y favorecer la protección de las plantas.

Uno de los casos más relevantes en la prevención de las enfermedades es el de la supresión del desarrollo de patógenos en ciertos suelos. Estos suelos, denominados *supresivos* (es decir, que impiden el desarrollo de enfermedad), han sido reportados alrededor del mundo y en muchos casos existe una clara evidencia de la contribución de la microbiota en estos resultados. Existen, principalmente, dos tipos de supresividad: el primero, la supresividad general, debida al efecto de la biomasa total de microorganismos, y el segundo, la supresividad específica, debida a la acción específica de poblaciones de microorganismos (Weller, Raaijmakers, Gardener, & Thomashow, 2002). Esta última es de gran interés en el control biológico, ya que

la identificación de estas poblaciones, el entendimiento de sus funciones e interacciones y la recuperación de estas comunidades pueden emplearse para reducir la severidad de las enfermedades en los cultivos. Los mecanismos de supresividad específica incluyen la interacción de supresión directa sobre un patógeno (cuando los microorganismos del suelo inhiben el establecimiento del patógeno) y la supresividad indirecta (cuando el microbioma estimula el sistema inmune de la planta) (Lugtenberg & Kamilova, 2009).

La existencia de suelos con comunidades supresivas ha sido reportada para múltiples cultivos como papa y manzana. Por ejemplo, a mediados del siglo pasado, algunos estudios en papa reportaron la presencia de agentes atenuadores de la enfermedad de la costra negra de la papa en suelos que llevaban mucho más tiempo de producción que en aquellos que llevaban menos de quince años. En el estudio de Menzies (1959) se demostró que a través del tiempo el suelo desarrollaba supresividad a la enfermedad y que esta desaparecía cuando el suelo era esterilizado, lo que suponía una importante influencia biológica. Dichos estudios abrieron la puerta para otros trabajos que han demostrado la importancia del factor microbiológico del suelo en el desarrollo de las enfermedades. Weller et al. (2002) presentan una revisión completa de la historia de la supresividad. Un estudio más reciente en remolacha demostró, por medio de técnicas dependiente e independiente de cultivo, que los microorganismos de las clase gamma-proteobacteria presentes en la rizosfera presentan una clara actividad supresiva contra el patógeno *Rhizoctonia solani* (Mendes, 2012).

A pesar de la evidencia de la presencia de comunidades supresivas, delimitarlas y aprovecharlas propone importantes retos tecnológicos y de conocimiento, ya que es imposible recuperar estas comunidades complejas y megadiversas en los cultivos. Por lo tanto, uno de los retos más grandes es poder identificar cuáles organismos dentro de la enorme diversidad son fundamentales y necesarios para generar el efecto supresivo. La evidencia recolectada por Agler et al. (2016) en su estudio sobre *Arabidopsis thaliana* sugiere que para favorecer o suprimir el desarrollo de enfermedades no son necesarios todos los organismos de la comunidad, ya que la presencia de algunas especies clave puede conducir al establecimiento de los demás microorganismos. En la misma línea, algunos autores sugieren que inocular microorganismos colaboradores clave (cepas auxiliares) junto con los biocontroladores puede aumentar su efectividad (Massart et al., 2015), ya que las comunidades microbianas pueden influir directamente en el desarrollo de antibiosis, parasitismo o competencia, pero también pueden tener un papel indirecto al estimular las defensas de las plantas o la supervivencia y la actividad de los agentes biocontroladores. Una mejor comprensión del microbioma también permitirá identificar estas cepas microbianas auxiliares que potencialicen la eficacia de los agentes biocontroladores. En el capítulo 4 sobre "Estudios del microbioma y su aplicación en el control biológico de fitopatógenos" se profundiza sobre este tema.

Elicitores

Según Goyal, Lambert, Cluzet, Mérillon y Ramawat (2012), los elicitores son factores físicos o químicos que estimulan una respuesta de defensa en la planta. Los primeros, cuando se utilizan en pequeñas dosis, le generan estrés a la planta y esto desencadena la producción de moléculas de señalización, en tanto que las sustancias químicas elicitoras son reconocidas mediante receptores específicos presentes en las células vegetales. que, en pequeñas concentraciones, desencadenan efectos morfológicos y fisiológicos. Los elicitores se pueden dividir en dos tipos: bióticos y abióticos. Los elicitores abióticos son factores físicos o sustancias tales como las sales orgánicas, mientras que los elicitores bióticos se derivan de microorganismos (hongos, bacterias, virus) o son componentes de la pared celular de la planta. Los elicitores bióticos también incluyen productos químicos liberados por las plantas contra fitopatógenos o por el ataque de herbívoros (Namdeo, 2007). Estos pueden ser polisacáridos, productos derivados de las paredes de las células vegetales (pectina o celulosa), de gomas de plantas y de microorganismos (quitina o glucanos) y glicoproteínas o proteínas intracelulares cuyas funciones están acopladas a receptores que actúan activando o inactivando una serie de enzimas o canales de hierro (tabla 20.2). Por lo tanto, los elicitores se pueden dividir en función de su fuente como *exógenos* y

endógenos. Los primeros se originan en el patógeno, en microorganismos benéficos o en otros agentes externos y, en su mayoría, tienen movilidad dentro de los tejidos vegetales. Los elicitores endógenos son de origen vegetal y se producen como resultado de la interacción con el patógeno o con otros microorganismos.

Los microorganismos de la rizosfera, como las PGPR y algunas cepas de *Trichoderma* spp., pueden actuar como elicitores bióticos, ya que tienen el potencial de inducir la síntesis de metabolitos secundarios en las plantas. Por ejemplo, al estudiar el efecto de las PGPR *P. putida* (PP-168) y *P. fluorescens* (PF-187) en la raíz de *Hyoscyamus niger* se observó un aumento en el tamaño de los brotes y un aumento de dos alcaloides: tropano hyoscyamine (HYO) y escopolamina (SCO) (Ghorbanpour, Hatami, & Khavazi, 2013). En otros trabajos se ha encontrado que los lipopéptidos surfactina y fengicina, producidos por especies de *Bacillus* spp., también pueden actuar como elicitores, ya que estimulan las defensas de la planta (Raaijmakers, De Bruijn, Nybroe, & Ongena, 2010).

En estudios sobre frijol, las fengicinas y las surfactinas purificadas proporcionaron una protección significativa contra *Botrytis cinerea* mediada por resistencia sistémica

Tabla 20.2. Ejemplo de elicitores bióticos de uso común

Ácido araquidónico	Oligómeros de alginato
Ácido eicosapentaenoico	Oligómeros de alginato
Ácido péctico	Pectina
Alteromonas macleodii	*Phytophthora megasperma*, *Phytophthora cryptogea* y *Phytophthora sojae*
Aspergillus niger y *Aspergillus sojae*	Piezas de corcho exógeno
Botrytis cinerea	Poliaminas
Celulosa	Pol-L-lisina
Colletotrichum trifolii	*Pythium aphanidermatum*
Crudo de algas verde azules	Quitosán
Diaporthe phaseolorum	*Rhizopus arrhizus*
Enterobacter sakazaki	*Rhizoctonia bataticola*
Extracto de cuscuta	*Rhizoctonia solani*
Flagelina	*Sacharomyces cerevisiae*
Glicoproteínas	*Spodoptera frugiperda*
Glucanos	*Streptomyces melanosporofaciens* Syringolide
Glucomanosa	Systemina
Harpines	*Trichoderma viride*
Hemicelulasa	Ulva
Hepta-β-glucósidos	*Verticillum dahliae*
Laminarina	Volicitina (linolenilo N-L-glutamina)
Monilicolina	Elicitor de levadura

Fuente: Adaptada de Goyal et al. (2012)

inducida (*induced systemic resistance* [ISR por la sigla en inglés]). Este efecto contra el fitopatógeno fue similar al inducido por células vivas de la cepa productora de estos lipopéptidos *B. amyloliquefaciens* S499 (Ongena et al., 2007). De otra parte, Chowdhury et al. (2015) encontraron un incremento dramático en la expresión del gen de la defensina 1.2 (PDF1.2) cuando aplicaron células de la cepa de *B. amyloliquefaciens*.

Algunos hongos benéficos, tales como *Trichoderma* spp., también pueden inducir diferentes tipos de respuestas de defensa, una de ellas, mediante la activación de la ruta de los terpenoides con la consecuente producción de fitoalexinas. Esto se observó en plántulas de algodón en las que se relacionó esta inducción con el control de *Rhizoctonia solani* (Howell, Hanson, Stipanovic, & Puckhaber, 2000). Este hongo también induce respuestas de defensa relacionadas con la expresión de proteínas PR, que tienen efecto en la supresión local y sistémica de la enfermedad (Keswani, Mishra, Sarma, Singh, & Singh, 2014; Vinale et al., 2008). Cotes, Lepoivre y Semal (1996) demostraron, en plántulas de frijol, altos niveles de endoquitinasas y endo-β-1,3-glucanasas de origen vegetal cuando las semillas eran tratadas antes de la siembra con *Trichoderma koningiopsis*, respuesta que estuvo relacionada con el control de *Pythium splendens*. Este mismo microorganismo estimuló respuestas de resistencia sistémica relacionadas con la expresión de ácido jasmónico y etileno en ensayos efectuados en tomate contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Moreno et al., 2009). En algodón, el tratamiento con *Trichoderma virens*, además de fitoalexinas, estimuló la actividad POX (Djonović, Pozo, Dangott, Howell, & Kenerley, 2006; Djonović et al., 2007). De otra parte, en plántulas de *Arabidopsis* tratadas con la cepa T22 de *T. harzianum* se encontró una elevada expresión del gen de NPR1 relacionada con el control de *Pythium ultimum* (Shoresh, Harman, & Mastouri, 2010).

Estas respuestas de defensa de la planta se activan por el metabolismo de la ruta de los fenilpropanoides (PP) en la que la fenilalanina amonio liasa (PAL) cataliza el primer paso importante del metabolismo general de los PP; de este modo se produce la síntesis de los compuestos que tienen un rol indispensable en la defensa, como los involucrados en el fortalecimiento y la reparación de la pared celular (suberina y lignina), los que tienen actividad antimicrobiana (fitoalexinas tipo isoflavonas) y la señalización del ácido salicílico (SA) (Hammerschmidt, 1999).

Otros hongos benéficos como la micorriza *Piriformospora indica* también han sido reportados por inducir respuestas de defensa en las plantas contra patógenos del suelo mediada por el ácido jasmónico (JA) (Serfling, Wirsel, Lind, & Deising, 2007; Stein, Molitor, Kogel, & Waller, 2008).

De otra parte, dándole sustento a los beneficios relacionados con el uso de consorcios microbianos, se encontró que una mezcla de *Trichoderma*, *Bacillus* y *Rhizobium* spp. estimuló el sistema de defensa mediado por el ácido jasmónico JA en garbanzo ante la presencia *S. rolfsii* (Singh, Sarma, Upadhyay, & Singh, 2013). Resultados similares de inducción de la resistencia en arveja fueron reportados por Jain, Singh, Singh y Singh (2015) cuando usaron una mezcla de *Trichoderma* spp., *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp. contra *S. sclerotinia* y encontraron un incremento significativo de enzimas relacionadas con la defensa de las plantas (Mishra, Tewari, Singh, & Kumar, 2015).

Los elicitores bióticos y abióticos tienen un gran potencial en la fitoprotección. Sin embargo, se requiere de un mejor conocimiento sobre los procesos de elicitación. De esta forma, se podría lograr una reducción en la aplicación de fungicidas y en las dosis requeridas para el control de enfermedades (Baider & Cohen, 2003), o podrían usarse junto con bioplaguicidas dentro de una estrategia de manejo integrado de enfermedades. Esto ha demostrado ser efectivo en el control de diferentes enfermedades, como en el caso de las pudriciones en la poscosecha causadas por *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* en frutos de kiwi: al combinar una levadura antagonista, *Candida diversa*, con el tratamiento con harpinas, que son proteínas que actúan como elicitores, se estimuló una respuesta hipersensible que permitió el control efectivo de ambas enfermedades. Esto demostró la inducción de la actividad de enzimas implicadas en la respuesta de defensa, tales como polifenol oxidasa, peroxidasa y superóxido dismutasa, además del aumento en el contenido de lignina en los kiwis (Tang et al., 2015).

RNAi: nueva estrategia de control de fitopatógenos basada en silenciamiento génico

A partir de la última década del siglo XX, los avances en las metodologías de investigación sobre los sistemas biológicos posibilitaron un incremento fundamental del conocimiento sobre su constitución y su funcionamiento. El auge de las disciplinas ómicas nutrieron diferentes ramas de la ciencia y generaron nuevas y revolucionarias aplicaciones en agricultura. Con el desarrollo de las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento (*high throughput*), se encuentran disponibles los genomas de cientos de microorganismos fitopatógenos en las bases de datos. Esto, sumado a la información generada en estudios de genómica estructural, constituye una fuente para la predicción *in silico* de genes vitales o relacionados con la patogenicidad y la virulencia de los fitopatógenos. Esta información se puede traducir en una estrategia para combatir agentes causales de enfermedades en plantas, en lo que se cataloga como *resistencia derivada del patógeno* o PDR (por la sigla en inglés de *pathogen-derived resistance*) (Panwar et al., 2016).

La investigación en genómica funcional de virus, hongos y bacterias fitopatógenas se ha valido de mecanismos de silenciamiento génico mediado por ARN, también conocido por *ARN de interferencia* o *ARNi* (Meena, Verma, & Kumhar, 2017). Este mecanismo, inicialmente, se aplicó como herramienta para caracterizar y validar funciones biológicas de genes que revelaron candidatos de patogenicidad y virulencia, y posteriormente, debido a su alto potencial en el desarrollo de estrategias de costo efectivas, ofreció nuevas oportunidades para acelerar los esfuerzos de control de fitopatógenos mediante el ataque de genes específicos esenciales para su supervivencia (Fondong, Nagalakshmi, & Dinesh-Kumar, 2016).

ARN de interferencia

El ARNi es un mecanismo de regulación genética, evolutivamente conservado en eucariotas, el cual es activado por la presencia de moléculas de ARN de doble cadena (dcARN), de tipo endógeno o exógeno, en el citoplasma de la célula. La consecuencia de su accionar es la hidrólisis específica de secuencias homólogas al dcARN efector, el cual participa en la identificación y la posterior destrucción de la secuencia específica blanco. Este mecanismo sirve para eliminar transcripciones de ARN mensajero (ARNm) foráneo de una manera específica en la secuencia de nucleótidos antes de que generen proteínas dañinas o invadan el genoma, por lo cual posee enormes potencialidades biotecnológicas (Groszhans & Filipowicz, 2008) (figura 20.5).

El descubrimiento del ARNi es uno de los mayores avances científicos de las últimas décadas y se ha descrito como cosupresión homóloga, *quelling* o silenciamiento génico postranscripcional PTGS (por la sigla en inglés de *post-transcriptional gene silencing*) o *knock-down* génico.

Antecedentes

En 1987, se reportó por primera vez el mecanismo de silenciamiento génico en la enzima nopalina sintasa (NOS) en plantas de tabaco, lo cual se evidenció por la pérdida de actividad en la enzima y su correspondiente señal en un *northern blot* (Rothstein, DiMaio, Strand, & Rice, 1987). Posteriormente, en plantas de petunia, se observó que las secuencias antisentido del gen de la enzima chalcone sintasa (CHS), la cual hace parte de la vía de síntesis de flavonoides, generaban pérdida de pigmentación en los pétalos (Van der Krol et al., 1988). En un intento por aumentar la pigmentación de las petunias mediante la sobreexpresión del gen CHS, se observó un efecto contrario debido a la inhibición postranscripción de la expresión del gen por la vía de degradación del ARNm (Napoli, Lemieux, & Jorgensen, 1990; Van der Krol, Mur, Beld, Mol, & Stuitje, 1990). Este fenómeno fue denominado *cosupresión* y su mecanismo fue desconocido por muchos años. Posteriores investigaciones fueron realizadas para describir el mismo mecanismo en otros organismos como hongos (*Neurospora crassa*) (Romano &

Macino, 1992), nematodos (*Caenorhabditis elegans*) (Guo & Kemphues, 1995), insectos (*Drosophila melanogaster*) (Pal-Bhadra, Bhadra, & Birchler, 1997) y protozoos (*Trypanosoma brucei*) (Ngo, Tschudi, Gull, K. & Ullu, 1998). Los investigadores Fire et al. (1998) lograron definir las características moleculares del proceso de interferencia en la expresión de los genes, denominado formalmente ARN *interferente* (ARNi), trabajo que fue reconocido con el Premio Nobel de Medicina o Fisiología en el 2006.

Funcionamiento

Se han estudiado en detalle las proteínas asociadas al mecanismo de silenciamiento en diferentes organismos, donde se han descrito nuevas proteínas involucradas en sistemas específicos. Sin embargo, el funcionamiento general del mecanismo de ARNi requiere unos componentes fundamentales: a) una molécula desencadenante, que es dcARN, la cual activa el mecanismo; sin embargo, otros inductores que incluyen isoformas y modificaciones de ARN como micro ARN (miARN) y ARN interferentes pequeños (siARN) actúan posteriormente; b) una proteína procesadora denominada *Dicer* o *Dicer-like* (DLC); c) los productos del procesamiento, que son ARN de tamaño pequeño, siARN o miARN; d) un complejo efector compuesto por ribonucleoproteínas denominado *complejo de silenciamiento* RISC (*RNA-induced silencing complex*), cuya principal proteína es AGO o argonauta; e) una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) (*RNA-dependent RNA polymerase*) que contribuye a amplificar la señal de inducción del mecanismo mediante la generación de ARN secundarios (Singh et al., 2016).

El mecanismo de ARNi inicia cuando la enzima Dicer reconoce los dcARN y los corta en pequeños fragmentos de doble cadena (aprox. 19-25 pb) denominados *siARN* en el citoplasma. Luego, los dcARN se separan en dos hebras y generan ARN de cadena sencilla (csARN); una hebra se denomina *pasajera* (la cual se degrada) y la otra hebra se denomina *guía*. La hebra guía se inserta en el complejo RISC que tiene actividad de digestión enzimática. Aunque en este complejo el actor principal es la proteína argonauta (AGO), se han descrito otras proteínas efectoras del complejo que reconocen los ARNdc y estimulan la actividad Dicer. Este complejo RISC activado con la hebra guía es el que desarrolla la estrategia de silenciamiento de genes, en la cual identifica y captura el ARNm en el citoplasma de la célula y lo corta para disminuir su vida media y evitar su traducción.

Aunque no es completamente claro cómo la hebra guía en el complejo RISC se une a su ARNm blanco, se conoce que es un proceso específico de secuencia. El extremo 5' de la hebra guía está implicado en la adaptación y unión del ARNm diana, mientras que el extremo 3' localiza el ARNm en el sitio favorable para su corte por RISC. Una vez que el ARNm blanco es identificado y capturado, el proceso entero se desencadena por la amplificación del proceso de clivaje a través de la síntesis de dcARN adicionales a partir de los fragmentos de ARNm digeridos inicialmente. Por otra parte, el ARN guía también puede ser amplificado en algunos organismos como plantas e invertebrados por la acción de la ARN polimerasa dependiente del ARN (RdRP), lo cual da lugar a la generación secundaria de moléculas de dcARN que, a su vez, pueden conducir a la formación de nuevas moléculas de siRNA que mejoran y propagan sistemáticamente la degradación del ARNm objetivo en el citoplasma (figura 20.5) (Singh et al., 2016).

Aplicaciones

Existen diversas estrategias para reducir las pérdidas causadas por enfermedades, y entre ellas está el desarrollo de plantas resistentes a diferentes fitopatógenos. Debido a que las plantas utilizan el mecanismo de ARNi para controlar la progresión de las infecciones por patógenos de forma natural (Szittya & Burgyán, 2013; Tenllado, Llave, & Díaz-Ruíz, 2004), en las últimas dos décadas el silenciamiento por ARN se ha utilizado para generar cultivos resistentes (Duan, Wang, & Guo, 2012).

Con base en el mecanismo denominado *silenciamiento génico inducido por el hospedero* o HIGS (por la sigla en inglés de *host induced gene silencing*), se han desarrollado diversos enfoques de control, entre los cuales está la generación de plantas transgénicas que presentan inmunidad contra el patógeno mediante la

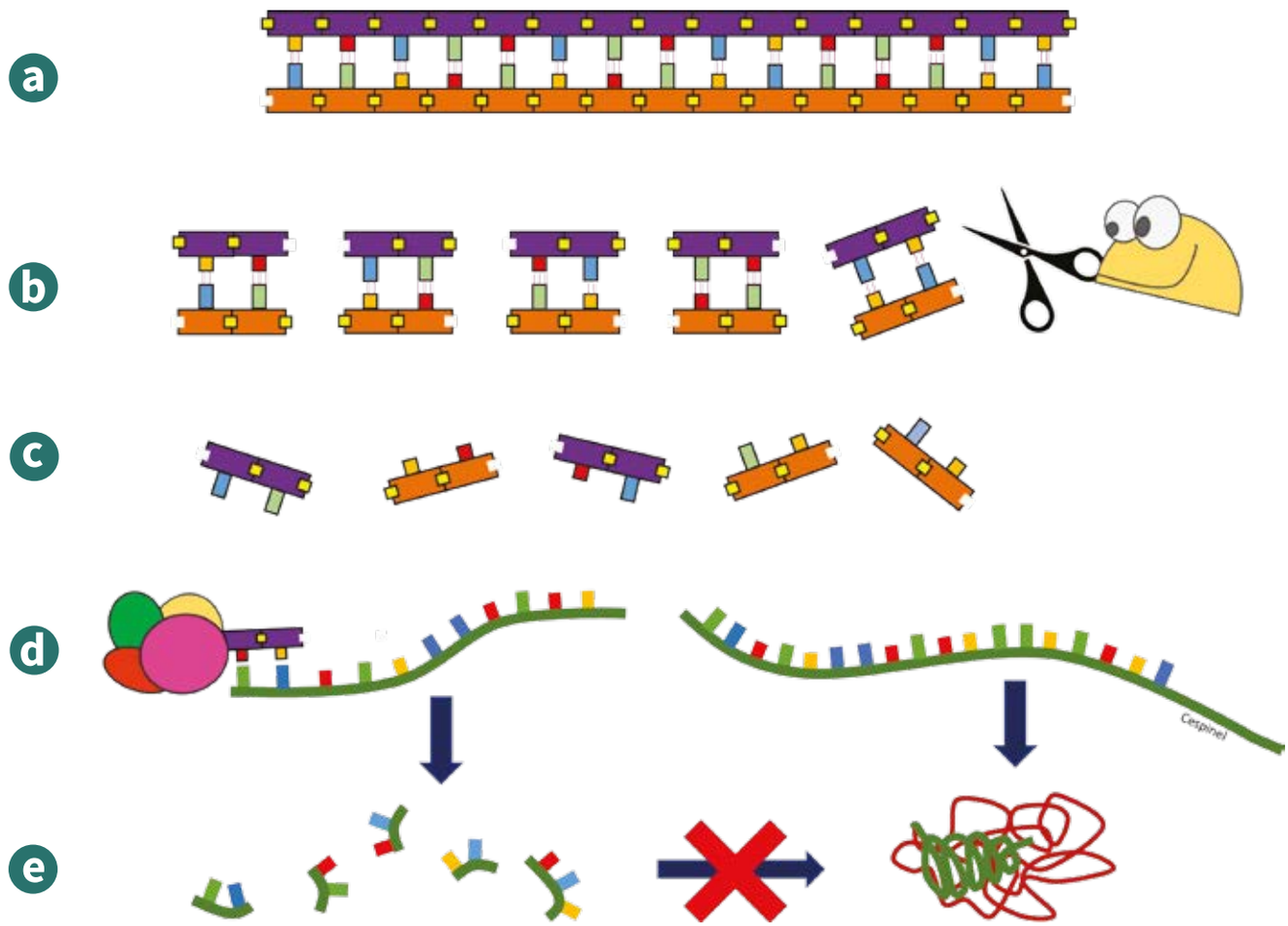


Figura 20.5. Mecanismo general de ARN interferente. a. Molécula desencadenante, generalmente ARNdc en el citoplasma celular; b. Fragmentación del ARNdc por una proteína procesadora denominada *Dicer* o *Dicer-like*; c. Productos del procesamiento ARNs de tamaño pequeño, donde se separan la hebra guía y la hebra pasajera; d. Conformación de complejo efector RISC (*RNA-induced silencing complex*) con su proteína argonauta (AGO) y selección de la hebra guía; reconocimiento específico del ARNm por RISC cargado con el RNA; e. Acción del complejo RISC para atacar e hidrolizar el ARNm diana, evitando así su traducción y formación de proteína.

Fuente: Elaboración propia

expresión endógena de dcARN. Bajo esta estrategia ampliamente estudiada, inicialmente se desarrollaron variedades vegetales resistentes a los virus patógenos, que imitan los mecanismos antivirales naturales de silenciamiento del ARN (Kusaba, 2004), y durante la última década se desarrollaron transgénicos para el control de hongos, nematodos e insectos (Huang, Allen, Davis, Baum, & Hussey, 2006; Mao et al., 2007; Nowara et al., 2010; Nunes & Dean, 2012).

Debido a las limitantes que existen para el desarrollo de plantas transgénicas, como la carencia de protocolos de transformación estandarizados para muchos cultivos de importancia comercial, la inestabilidad de las características transformadas y la preocupación sobre el uso de organismos genéticamente modificados (OGM), se desarrolló otro enfoque de control con la aplicación del mecanismo HIGS (Wang & Jin, 2017). Esta nueva estrategia utiliza la síntesis de moléculas de dcARN y siARN exógenas *in vitro* o *in vivo* en sistemas alternativos para su posterior administración en los cultivos (Wang, Thomas, & Jin, 2017).

En este sentido, los conceptos de tráfico de ARN entre organismos de reinos cruzados y el ARNi ambiental son fundamentales para la aplicación de HIGS de

forma tópica. El primer concepto implica que las moléculas de ARNi se pueden movilizar e interactuar entre una planta hospedera y sus correspondientes patógenos o parásitos (Knip, Constantin, & Thordal-Christensen, 2014), y este tráfico permite la aplicación de estrategias de protección basadas en HIGS. El segundo concepto implica que las moléculas de ARN externas pueden inducir el mecanismo de ARNi y se denominan *moléculas de ARN ambiental* (Wang et al., 2017). Teniendo en cuenta estos dos conceptos, varios trabajos han demostrado que los dcARN y sARN que tienen como blanco secuencias de patógenos se pueden aplicar tópicamente para el control de enfermedades producidas por virus y hongos (Koch et al., 2016; Mitter et al., 2017; Wang et al., 2016). Esta estrategia ha sido denominada *silenciamiento génico inducido por atomización* o SIGS (por la sigla en inglés de *spray-induced gene silencing*). En el caso de *Fusarium graminearum*, se observó que la aplicación tópica de moléculas de dcARN dirigidas contra genes del patógeno generó la reducción de la enfermedad en las hojas de cebada, la cual se extendió a hojas que no fueron expuestas y sugirien que las señales de interferencia se esparcen a partes distales de la planta.

Lo anterior se demostró al observar ARN fluoromarcados en xilema, parénquima del floema, células del mesófilo, tricomas y estomas (Koch et al., 2016). Resultados similares se observaron con la estrategia de aplicación tópica de moléculas de ARNi dirigidas contra *Botrytis cinerea* para el control del moho gris (Wang et al., 2016). De acuerdo con lo anterior, la estrategia de SIGS tiene gran potencial para la protección contra patógenos de productos poscosecha durante el procesamiento, el transporte y el almacenaje, incluyendo aquellos hongos que pueden producir micotoxinas perjudiciales para la salud del consumidor (Majumdar, Rajasekaran, & Cary, 2017).

Las estrategias de SIGS requieren un sistema de liberación en campo, como cualquier otra estrategia de control biológico. Las moléculas de ARNs desnudas pueden ser lábiles a las condiciones ambientales, por lo cual es necesario formularlas para su liberación. Los recientes avances en nanotecnología han mejorado el potencial de los SIGS para el control de patógenos en los cultivos. En una publicación reciente, se describe un sistema de formulación de los ARNs mediante su incorporación en nanopartículas denominadas *BioClay* (Mitter et al., 2017), cuya protección previno la degradación por ARNasas y por luz solar, además de proteger contra el lavado de las hojas con agua. Este trabajo demostró que la aplicación de ARNdc formulado en las hojas protegió la planta de la infección por virus (Mitter et al., 2017).

La aplicación de los SIGS es específica y ambientalmente segura, con baja probabilidad de que los patógenos desarrollen mecanismos de resistencia, y su uso podría ser más aceptado que el de OGM (Wang & Jin, 2017).

Consideraciones finales

El ARNi se convirtió en una herramienta altamente eficaz para silenciar la expresión génica de diversos patógenos que afectan los cultivos. El enfoque de SIGS abre nuevas puertas a una infinidad de aplicaciones biotecnológicas para la protección de cultivos, que además es respetuosa con el medioambiente. Esta estrategia puede ser aplicada mezclando múltiples secuencias blanco para el control de diversos patógenos. Muchas de las aplicaciones de ARNi son evaluadas actualmente para su comercialización o se encuentran en producción comercial.

Conclusiones y perspectivas

Es bien conocida la importancia de los microorganismos biocontroladores para mantener la sostenibilidad de los agroecosistemas. Sin embargo, a pesar de los progresos en esta materia, aún quedan muchos desafíos para responderle a las necesidades de los agricultores. Es necesario desarrollar nuevas estrategias para el control de enfermedades que aún no cuentan con estrategias biológicas de manejo y también es importante aumentar los niveles de control hasta ahora obtenidos en muchos patosistemas para garantizar una mayor consistencia y lograr beneficios adicionales al simple manejo de enfermedades (biofertilización, biorremediación, mayor espectro de control, etc.). Aunque se han estudiado varias facetas de las interacciones entre la planta, los microorganismos biocontroladores y otros componentes (bioestimulantes, elicitores, etc.), todavía hay un largo camino por recorrer para lograr un mayor conocimiento que permita garantizar la eficacia y la consistencia de la integración de muchos componentes a la vez dentro de una estrategia de manejo integrado de cultivos.

Referencias

Abdelfattah, A., Wisniewski, M., Droby, S., & Schena, L. (2016). Spatial and compositional variation in the fungal communities of organic and conventionally grown apple fruit at the consumer point-of-purchase. *Horticulture Research, 3*, 16047. doi:10.1038/hortres.2016.47.

Abo-Amer, A. (2011). Biodegradation of diazinon by *Serratia marcescens* DI101 and its use in bioremediation of contaminated environment. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *21*(1), 71-80.

Adams, P., De-Leij, F. A. A. M., & Lynch, J. M. (2007). *Trichoderma harzianum* rifai 1295-22 mediates growth promotion of crack willow (*Salix fragilis*) saplings in both clean and metal-contaminated soil. *Microbial Ecology*, *54*(2), 306-313.

Agler, M. T., Ruhe, J., Kroll, S., Morhenn, C., Kim, S.-T., Weigel, D., & Kemen, E. M. (2016). Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation. *Plos Biology*, *14*(1): e1002352. doi:10.1371/journal.pbio.1002352.

Aino, M., Iwamoto, Y., Hashimoto, Y., & Ishikawa, K. (2007). *Effect of the endophytic bacteria in lettuce (Lactuca sativa) roots suppressing infection of Olpidium virulentus viral vector for lettuce big-vein virus and possibility of the control of lettuce big-vein diseases by the endophytic bacteria*. Kasai, Japón: Technology Center for Agriculture, Forestry and Fisheries.

Alabouvette, C., & Cordier, C. (2011). Risks of microbial biocontrol agents and regulation: are they in balance? En R. U. Ehlers (Eds.). *Regulation of biological control agents* (pp. 157-173). Dordrecht, Holanda: Springer.

Algam, S. A., Xie, G., Li, B., Yu, S., Su, T., & Larsen, J. (2010). Effects of *Paenibacillus* strains and chitosan on plant growth promotion and control of *Ralstonia* wilt in tomato. *Journal of Plant Pathology*, *92*(3), 593-600.

Altomare, C., Norvell, W. A., Björkman, T., & Harman, G. E. (1999). Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* rifai 1295-22. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(7), 2926-2933.

Andreoni, V., Colombo, M., Colombo, A., Vecchio, A., & Finoli, C. (2003). Cadmium and zinc removal by growing cells of *Pseudomonas putida* strain B14 isolated from a metal-impacted soil. *Annals of Microbiology, 53*(2), 135-148.

Arshad, M., & Frankenberger Jr., W. T. (1993). Microbial production of plant growth regulators. En F. B. Metting Jr. (Ed.), *Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management* (pp. 307-347). Nueva York, EE. UU.: Marcell Dekker Inc.

Badawy, M. E. I., & Rabea, E. I. (2011). A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection. *International Journal of Carbohydrate Chemistry, 2011*, 1-29. doi:10.1155/2011/460381.

Badri, D. V., & Vivanco, J. M. (2009). Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell & Environment*, *32*(6), 666-681. doi:10.1111/j.1365-3040.2008.01926.x.

Baider, A., & Cohen, Y. (2003). Synergistic interaction between BABA and mancozeb in controlling *Phytophthora infestans* in potato and tomato and *Pseudoperonospora cubensis* in cucumber. *Phytoparasitica*, *31*(4), 399-409. doi:10.1007/BF02979812.

Barber, M. S., Bertram, R. E., & Ride, J. P. (1989). Chitin oligosaccharides elicit lignification in wounded wheat leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *34*(1), 3-12. doi:10.1016/0885-5765(89)90012-X.

Behlau, F., Canteros, B. I., Minsavage, G. V., Jones, J. B., & Graham, J. H. (2011). Molecular characterization of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(12), 4089-4096. doi:10.1128/AEM.03043-10.

Bender, C. L., & Cooksey, D. A. (1986). Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. tomato: conjugative transfer and role in copper resistance. *Journal of Bacteriology*, *165*(2), 534-541.

Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their

potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, *35*(4), 1044-1051.

Benhamou, N., Kloepper, J. W., & Tuzun, S. (1998). Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Planta*, *204*(2), 153-168. doi:10.1007/s004250050242.

Berg, G., Eberl, L., & Hartmann, A. (2005). The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology*, *7*(11), 1673-1685. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00891.x.

Berg, G., Grube, M., Schloter, M., & Smalla, K. (2014). Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, *5*, 148. doi:10.3389/fmicb.2014.00148.

Berg, G., Rybakova, D., Grube, M., & Koberl, M. (2016). The plant microbiome explored: implications for experimental botany. *Journal of Experimental Botany*, *67*(4), 995-1002. doi:10.1093/jxb/erv466.

Bhattacharyya, P., & Jha, D. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*(4), 1327-1350. doi:10.1007/s11274-011-0979-9.

Bosmans, L., De Bruijn, I., Gerards, S., Moerkens, R., Van Looveren, L., Wittemans, … Lievens, B. (2017). Potential for biocontrol of hairy root disease by a *Paenibacillus* clade. *Frontiers in Microbiology 8*, 1-11. doi:10.3389/fmicb.2017.00447.

Bulgarelli, D., Rott, M., Schlaeppi, K., Ver Loren van Themaat, E., Ahmadinejad, N., Assenza, F., … Schulze-Lefert, P. (2012). Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature*, *488*(7409), 91-95. doi:10.1038/nature11336.

Cai, F., Yu, G., Wang, P., Wei, Z., Fu, L., Shen, Q., Chen, W. (2013). Harzianolide, a novel plant growth regulator and systemic resistance elicitor from *Trichoderma harzianum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, *73*, 106-113. doi:10.1016/j.plaphy.2013.08.011.

Calvo, P., Nelson, L., & Kloepper, J.W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil*, *383*(1-2), 3-41. doi:10.1007/s11104-014-2131-8.

Campbell, R. (1991). *Biological control of microbial plant pathogens*. Nueva York, EE. UU.: Cambridge University Press.

Castillo, D., & Sword, G. A. (2015). The endophytic fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Purpureocillium lilacinum* enhance the growth of cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*) and negatively affect survival of the cotton bollworm (*Helicoverpa zea*). *Biological Control*, *89*, 53-60.

Chakroun, H., Mechichi, T., Martinez, M. J., Dhouib, A., & Sayadi, S. (2010). Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Trichoderma atroviride*: application on bioremediation of phenolic compounds. *Process Biochemistry*, *45*(4), 507-513. doi:10.1016/j.procbio.2009.11.009.

Chen, F., Gao, Y., Chen, X., Yu, Z., & Li, X. (2013). Quorum quenching enzymes and their application in degrading signal molecules to block Quorum sensing-dependent infection. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(9), 17477-17500. doi:10.3390/ijms140917477.

Chen, S.-K., Edwards, C. A., & Subler, S. (2001). Effects of the fungicides benomyl, captan and chlorothalonil on soil microbial activity and nitrogen dynamics in laboratory incubations. *Soil Biology & Biochemistry*, *33*(14), 1971-1980.

Chen, T. H., & Murata, N. (2011). Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. *Plant, Cell & Environment*, *34*(1), 1-20. doi:10.1111/j.1365-3040.2010.02232.x.

Chowdhury, S. P., Uhl, J., Grosch, R., Alquéres, S., Pittroff, S., Dietel, K., … Hartmann, A. (2015). Cyclic lipopeptides of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* colonizing the lettuce rhizosphere enhance plant defense responses toward the bottom rot pathogen Rhizoctonia solani. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *28*(9), 984-995. doi:10.1094/MPMI-03-15-0066-R.

Civerolo, E., & Keil, H. (1969). Inhibition of bacterial spot of peach foliage by *Xanthomonas pruni* bacteriophage. *Phytopathology*, *59*, 1966-1967.

Cohen, E. (2001). Chitin synthesis and inhibition: a revisit. *Pest Management Science*, *57*(10), 946-950. doi:10.1002/ps.363.

Colla, G., Rouphael, Y., Canaguier, R., Svecova, E., & Cardarelli, M. (2014). Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 448. doi:10.3389/fpls.2014.00448.

Conrath, U., Domard, A., & Kauss, H. (1989). Chitosan-elicited synthesis of callose and of coumarin derivatives in parsley cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*, *8*(3), 152-155. doi:10.1007/BF00716829.

Cooksey, D. A. (1990). Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, *28*, 201-219. doi:10.1146/annurev.py.28.090190.001221.

Cooksey, D. A. (1994). Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *14*(4), 381-386.

Coons, G. H., & Kotila, J. E. (1925). The transmissible lytic principle (bacteriophage) in relation to plant pathogens. *Phytopathology*, *15*, 357-370.

Cooper, R. L., Laws, S. C., Das, P. C., Narotsky, M. G., Goldman, J. M., Lee Tyrey, E., & Stoker, T. E. (2007). Atrazine and reproductive function: mode and mechanism of action studies. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, *80*(2), 98-112.

Copeland, J. K., Yuan, L., Layeghifard, M., Wang, P. W., & Guttman, D. S. (2015). Seasonal community succession of the phyllosphere microbiome. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *28*(3), 274-285. doi:10.1094/MPMI-10-14-0331-FI.

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.

Craigie, J. S. (2011). Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *Journal of Applied Phycology*, *23*(3), 371-393. doi:10.1007/s10811-010-9560-4.

D'Herelle, F. (1911). Sur une épizootie de nature bactérienne sévissant sur les sauterelles au Mexique. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Acadédemie des sciences*, *152*, 1413-1415.

Dalton, D. A., Kramer, S., Azios, N., Fusaro, S., Cahill, E., Kennedy, C. (2004). Endophytic nitrogen fixation in dune grasses (*Ammophila arenaria and Elymus mollis*) from Oregon. *FEMS Microbiology Ecology*, *49*(3), 469-479. doi:10.1016/j.femsec.2004.04.010.

Das, K., & Mukherjee, A. K. (2007). Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*, *98*(7), 1339-1345. doi:10.1016/j.biortech.2006.05.032.

De Jin, R., Suh, J. W., Park, R. D., Kim, Y. W., Krishnan, H., & Kim, K. Y. (2005). Effect of chitin compost and broth on biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Nematology*, *7*(1), 125-132.

De Vasconcellos, R. L. F., & Cardoso, E. J. B. N. (2009). Rhizospheric streptomycetes as potential biocontrol agents of *Fusarium* and *Armillaria* pine rot and as PGPR for *Pinus taeda*. *BioControl*, *54*(6), 807.

Dick, R. P. (1992). A review: long-term effects of agricultural systems on soil biochemical and microbial parameters. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *40*(1-4), 25-36. doi:10.1016/0167-8809(92)90081-L.

Djonović, S., Pozo, M. J., Dangott, L. J., Howell, C. R., & Kenerley, C. M. (2006). Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* Induces plant defense responses and systemic resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *19*(8), 838-853. doi:10.1094/MPMI-19-0838.

Djonović, S., Vargas, W. A., Kolomiets, M. V., Horndeski, M., Wiest, A., & Kenerley, C. M. (2007). A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. *Plant Physiology*, *145*(3), 875-889. doi:10.1104/pp.107.103689.

Dong, Y.-H., Xu, J.-L., Li, X.-Z., & Zhang, L.-H. (2000). AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(7), 3526-3531. doi:10.1073/pnas.060023897.

Doornbos, R. F., van Loon, L. C., & Bakker, P. A. H. M. (2012). Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, *32*(1), 227-243. doi:10.1007/s13593-011-0028-y.

Du Jardin, P. (2012). *The Science of Plant Biostimulants - A bibliographic analysis*. [Ad hoc study report to the European Commission DG Enterprise and Industry]. Recuperado de http://hdl.handle.net/2268/169257.

Du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, *196*, 3-14. doi:10.1016/j.scienta.2015.09.021.

Duan, C.-G., Wang, C.-H., & Guo, H.-S. (2012). Application of RNA silencing to plant disease resistance. *Silence*, *3*(1), 5. doi:10.1186/1758-907X-3-5.

Duffy, B. K., Simon, A., & Weller, D. (1996). Combination of *Trichoderma koningii* with fluorescent pseudomonads for control of take-all on wheat. *Phytopathology*, *86*(2), 188-194. Recuperado de https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1996Articles/Phyto86n02_188.pdf.

Dye, D. W. (1953). Control of *Pseudomonas syringae* with streptomycin. *Nature*, *172*, 683-684. doi:10.1038/172683a0.

El-Ghaouth, A., Arul, J., Ponnampalam, R., & Boulet, M. (1991). Use of chitosan coating to reduce water loss and maintain quality of cucumber and bell pepper fruits. *Journal of Food Processing and Preservation*, *15*, 359-368. doi:10.1111/j.1745-4549.1991.tb00178.x.

El-Ghaouth, A., Ponnampalam, R., Castaigne, F., & Arul, J. (1992). Chitosan coating to extend the storage life of tomatoes. *HortScience*, *27*(9), 1016-1018.

El-Mohamedy, R. S., Abdel-Kareem, F., Jaboun-Khiareddine, H., & Daami-Remadi, M. (2014). Chitosan and *Trichoderma harzianum* as fungicide alternatives for controlling *Fusarium* crown and root rot of tomato. *Tunisian Journal of Plant Protection*, *9*,

31-43. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/285023312_Chitosan_and_trichoderma_harzianum_as_fungicide_alternatives_for_controlling_fusarium_crown_and_root_rot_of_tomato.

El Hadrami, A., Adam, L. R., El Hadrami, I., & Daayf, F. (2010). Chitosan in plant protection. *Marine Drugs*, *8*(4), 968-987. doi:10.3390/md8040968.

Ezra, D., Castillo, U. F., Strobel, G. A., Hess, W. M., Porter, H., Jensen, J. B., … Yaver, D. (2004). Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. *Microbiology*, *150*(4), 785-793. doi:10.1099/mic.0.26645-0.

Ezzi, M. I., & Lynch, J. M. (2005). Biodegradation of cyanide by *Trichoderma* spp. and *Fusarium* spp. *Enzyme and Microbial Technology*, *36*(7), 849-854. doi:10.1016/j.enzmictec.2004.03.030.

Faeth, S. H., & Fagan, W. F. (2002). Fungal endophytes: Common host plant symbionts but uncommon mutualists. *Integrative and Comparative Biology*, *42*(2), 360-368. doi:10.1093/icb/42.2.360.

Fakhro, A., Andrade-Linares, D. R., Von Bargen, S., Bandte, M., Büttner, C., Grosch, R., … Franken, P. (2010). Impact of *Piriformospora indica* on tomato growth and on interaction with fungal and viral pathogens. *Mycorrhiza*, *20*(3), 191-200. doi:10.1007/s00572-009-0279-5.

Felix, G., Baureithel, K., & Boller, T. (1998). Desensitization of the perception system for chitin fragments in tomato cells. *Plant Physiology*, *117*(2), 643-650.

Felix, G., Regenass, M., & Boller, T. (1993). Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalinization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *The Plant Journal*, *4*(2), 307-316. doi:10.1046/j.1365-313X.1993.04020307.x.

Ferri, M., Franceschetti, M., Naldrett, M. J., Saalbach, G., & Tassoni, A. (2014). Effects of chitosan on the protein profile of grape cell culture subcellular fractions. *Electrophoresis*, *35*(11), 1685-1692. doi:10.1002/elps.201300624.

Figueroa-López, A. M., Cordero-Ramírez, J. D., Martínez-Álvarez, J. C., López-Meyer, M., Lizárraga-Sánchez, G. J., Félix-Gastélum, R., … Maldonado-Mendoza, I. E. (2016). Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides*. *Springerplus*, *5*, 330. doi:10.1186/s40064-016-1780-x.

Figueroa-López, A. M., Cordero-Ramírez, J. D., Quiroz-Figueroa, F. R., & Maldonado-Mendoza, I. E. (2014). A high-throughput screening assay to identify bacterial antagonists against *Fusarium verticillioides*. *Journal of Basic Microbiology*, *54*(1), S125-133. doi:10.1002/jobm.201200594.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E, & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, *391* (6669), 806-811.

Fondong, V. N., Nagalakshmi, U., & Dinesh-Kumar, S. P. (2016). Novel functional genomics approaches: a promising future in the combat against plant viruses. *Phytopathology*, *106*(10), 1231-1239. doi:10.1094/PHYTO-03-16-0145-FI.

Forchetti, G., Masciarelli, O., Alemano, S., Alvarez, D., & Abdala, G. (2007). Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *76*(5), 1145-1152. doi:10.1007/s00253-007-1077-7.

Frampton, R. A., Pitman, A. R., & Fineran, P. C. (2012). Advances in bacteriophage-mediated control of plant pathogens. *International Journal of Microbiology*, *2012*, 1-11. doi:10.1155/2012/326452.

Fravel, D. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, *43*, 337-359. doi:10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924.

Ghorbanpour, M., Hatami, M., & Khavazi, K. (2013). Role of plant growth promoting rhizobacteria on antioxidant enzyme activities and tropane alkaloid production of *Hyoscyamus niger* under water deficit stress. *Turkish Journal of Biology*, *37*(3), 350-360. doi:10.3906/biy-1209-12.

Gill, J., & Abedon, S. T. (2003). Bacteriophage ecology and plants. *APS Feature Stories*. doi:10.1094/APSnetFeature-2003-1103.

Giller, K. E., Witter, E., & Mcgrath, S. P. (1998). Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology & Biochemistry*, *30*(10-11), 1389-1414. doi:10.1016/S0038-0717(97)00270-8.

Gortari, M. C., & Hours, R. A. (2008). Fungal chitinases and their biological role in the antagonism onto nematode eggs. A review. *Mycological Progress*, *7*(4), 221-238. doi:10.1007/s11557-008-0571-3.

Goy, R. C., Britto, D., & Assis, O. B. G. (2009). A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros 19*(3), 241-247. doi:10.1590/S0104-14282009000300013.

Goyal, S., Lambert, C., Cluzet, S., Mérillon, J. M., & Ramawat, K. G. (2012). Secondary metabolites and plant defence. En J. M. Mérillon & K. G. Ramawat (Eds.), *Plant Defence: Biological Control* (pp. 109-138). Dordrecht, Países Bajos: Springer.

Gozzo, F., & Faoro, F. (2013). Systemic acquired resistance (50 years after discovery): moving from the lab to the field. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(51), 12473-12491. doi:10.1021/jf404156x.

Grose, J. H., & Casjens, S. R. (2014). Understanding the enormous diversity of bacteriophages: the tailed phages

that infect the bacterial family *Enterobacteriaceae*. *Virology*, *468*, 421-443. doi:10.1016/j.virol.2014.08.024.

Groszhans, H., & Filipowicz, W. (2008). Molecular biology: The expanding world of small RNAs. *Nature*, *451*(7177), 414-416. doi:10.1038/451414a.

Guo, H., Luo, S., Chen, L., Xiao, X., Xi, Q., Wei, W., ... Chen, J. (2010). Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulaor endophytic bacterium *Bacillus* sp. L14. *Bioresource Technology*, *101*(22), 8599-8605. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.085.

Guo, S., & Kemphues, K. J. (1995). par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, *81*(4), 611-620.

Haas, D., & Keel, C. (2003). Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual Review of Phytopathology*, *41*, 117-153. doi:10.1146/annurev.phyto.41.052002.095656.

Hadwiger, L. A. (2013). Multiple effects of chitosan on plant systems: Solid science or hype. *Plant Science*, *208*, 42-49. doi:10.1016/j.plantsci.2013.03.007.

Haichar, F. E. Z., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J. I., Prosser, J. I., Balesdent, J. M., ... Achouak, W. (2008). Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME Journal*, *2*(12), 1221-1230. doi:10.1038/ismej.2008.80.

Halpern, M., Bar-Tal, A., Ofek, M., Minz, D., Muller, T., & Yermiyahu, U. (2015). Chapter two - The use of biostimulants for enhancing nutrient uptake. En D. L. Sparks (Ed.), *Advances in Agronomy* (vol. 130, pp. 141-174). doi:10.1016/bs.agron.2014.10.001.

Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., & Kloepper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, *43*(10), 895-914. doi:10.1139/m97-131.

Hammerschmidt, R. (1999). Phytoalexins: What have we learned after 60 years? *Annual Review of Phytopathology*, *37*, 285-306. doi:10.1146/annurev.phyto.37.1.285.

Hardoim, P. R., Van Overbeek, L. S., & Elsas, J. D. v. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, *16*(10), 463-471. doi:10.1016/j.tim.2008.07.008.

Hariprasad, P., Navya, H., Chandra, S., & Niranjana, S. (2009). Advantage of using PSIRB over PSRB and IRB to improve plant health of tomato. *Biological Control*, *50*(3), 307-316. doi:10.1016/j.biocontrol.2009.04.002.

Harish, S., Kavino, M., Kumar, N., Balasubramanian, P., & Samiyappan, R. (2009). Induction of defense-related proteins by mixtures of plant growth promoting endophytic bacteria against *Banana bunchy top virus*. *Biological Control*, *51*(1), 16-25. doi:10.1016/j.biocontrol.2009.06.002.

Hirst, J. M., Le Riche, H. H., & Bascomb, C. L. (1961). Copper accumulation in the soils of apple orchards near wisbech. *Plant Pathology*, *10*(3), 105-108. doi:10.1111/j.1365-3059.1961.tb00127.x.

Hoitink, H., & Boehm, M. (1999). Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. *Annual Review of Phytopathology*, *37*, 427-446. doi:10.1146/annurev.phyto.37.1.427.

Hosseyni-Moghaddam, M. S., & Soltani, J. (2014). Bioactivity of endophytic *Trichoderma* fungal species from the plant family Cupressaceae. *Annals of Microbiology*, *64*(2), 753-761. doi:10.1007/s13213-013-0710-1.

Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, *87*(1), 4-10. doi:10.1094/PDIS.2003.87.1.4.

Howell, C. R., Hanson, L. E., Stipanovic, R. D., & Puckhaber, L. S. (2000). Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology*, *90*(3), 248-252. doi:10.1094/PHYTO.2000.90.3.248.

Huang, G., Allen, R., Davis, E. L., Baum, T. J., & Hussey, R. S. (2006). Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(39), 14302-14306. doi:10.1073/pnas.0604698103.

Huang, X., Chen, L., Ran, W., Shen, Q., & Yang, X. (2011). *Trichoderma harzianum* strain SQR-T37 and its bio-organic fertilizer could control *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber seedlings mainly by the mycoparasitism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *91*(3), 741-755. doi:10.1007/s00253-011-3259-6.

Hunter, R. D., Ekunwe, S. I., Dodor, D. E., Hwang, H.-M., & Ekunwe, L. (2005). *Bacillus subtilis* is a potential degrader of pyrene and benzo[a]pyrene. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *2*(2), 267-271.

Iriarte, F. B., Balogh, B., Momol, M. T., Smith, L. M., Wilson, M., & Jones, J. B. (2007). Factors affecting survival of bacteriophage on tomato leaf surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(6), 1704-1711. doi:10.1128/AEM.02118-06.

Iriti, M., Picchi, V., Rossoni, M., Gomarasca, S., Ludwig, N., Gargano, M., & Faoro, F. (2009). Chitosan antitranspirant activity is due to abscisic acid-dependent stomatal closure. *Environmental and Experimental Botany*, *66*, 493-500.

Iwamoto, Y., Aino, M., Kanto, T., & Maekawa, K. (2003). Effective fungicides on *Olpidium brassicae* causing lettuce big-vein disease and optimum drenching conditions. *Japanese Journal of Phytopathology*, *69*(4), 366-372.

Jain, A., Singh, A., Singh, S., & Singh, H. B. (2015). Biological management of *Sclerotinia sclerotiorum* in pea using plant growth promoting microbial consortium. *Journal of Basic Microbiology*, *55*(8), 961-972. doi:10.1002/jobm.201400628.

Jain, R., Poulos, M. G., Gros, J., Chakravarty, A. K., & Shuman, S. (2011). Substrate specificity and mutational analysis of *Kluyveromyces lactis* gamma-toxin, a eukaryal tRNA anticodon nuclease. *RNA*, *17*(7), 1336-1343. doi:10.1261/rna.2722711.

Jalilzadeh Yengejeh, R., Sekhavatjou, M., Maktabi, P., Arbab Soleimani, N., Khadivi, S., & Pourjafarian, V. (2014). The biodegradation of crude oil by *Bacillus subtilis* isolated from contaminated soil in hot weather areas. *International Journal of Environmental Research*, *8*(2), 509-514. doi:10.22059/ijer.2014.744.

Jetiyanon, K. (2007). Defensive-related enzyme response in plants treated with a mixture of *Bacillus strains* (IN937a and IN937b) against different pathogens. *Biological Control*, *42*(2), 178-185.

Kaku, H., Shibuya, N., Xu, P., Aryan, A. P., & Fincher, G. B. (1997). N-acetylchitooligosaccharides elicit expression of a single (1→3)-β-glucanase gene in suspension-cultured cells from barley (*Hordeum vulgare*). *Physiologia Plantarum*, *100*, 111-118. doi:10.1111/j.1399-3054.1997.tb03460.x.

Kannan, V., & Sureendar, R. (2009). Synergistic effect of beneficial rhizosphere microflora in biocontrol and plant growth promotion. *Journal of Basic Microbiology*, *49*, 158-164. doi:10.1002/jobm.200800011.

Katiyar, D., Hemantaranjan, A., & Singh, B. (2015). Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review. *Indian Journal of Plant Physiology*, *20*(1), 1-9. doi:10.1007/s40502-015-0139-6.

Katznelson, H. (1937). Bacteriophage in relation to plant diseases. *The Botanical Review*, *3*, 499. doi:10.1007/BF02870486.

Kauffman, G. L., Kneivel, D. P., & Watschke, T. L. (2007). Effects of a biostimulant on the heat tolerance associated with photosynthetic capacity, membrane thermostability, and polyphenol production of perennial ryegrass. *Crop Science*, *47*(1), 261-267. doi:10.2135/cropsci2006.03.0171.

Kembel, S. W., O'Connor, T. K., Arnold, H. K., Hubbell, S. P., Wright, S. J., & Green, J. L. (2014). Relationships between phyllosphere bacterial communities and plant functional traits in a neotropical forest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(38), 13715-13720. doi:10.1073/pnas.1216057111.

Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J., & Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, *274*(1), 1-14. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.11.019.

Keswani, C., Mishra, S., Sarma, B. K., Singh, S. P., & Singh, H. B. (2014). Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(2), 533-544. doi:10.1007/s00253-013-5344-5.

Khan, W., Rayirath, U. P., Subramanian, S., Jithesh, M. N., Rayorath, P., Hodges, D. M., … Prithiviraj, B. (2009). Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *Journal of Plant Growth Regulation*, *28*(4), 386-399. doi:10.1007/s00344-009-9103-x.

Kikuyama, M., Kuchitsu, K., & Shibuya, N. (1997). Membrane depolarization induced by N-acetylchitooligosaccharide elicitor in suspension-cultured rice cells. *Plant and Cell Physiology*, *38*(8), 902-909. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a029250.

Kloepper, J. W., Rodríguez-Kábana, R., Zehnder, A. W., Murphy, J. F., Sikora, E., & Fernández, C. (1999). Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential ext*ension to systemic and foliar diseases*. *Australasian Plant Pathology*, *28*(1), 21-26. doi:10.1071/AP99003.

Kloepper, J., Reddy, M., Rodríguez-Kabana, R., Kenney, D., Kokalis-Burelle, N., & Martinez-Ochoa, N. (2004). Application for rhizobacteria in transplant production and yield enhancement. *Acta Horticulturae*, *631*, 219-229. doi:10.17660/ActaHortic.2004.631.28.

Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., & Schroth, M. N. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, *286*, 885-886. doi:10.1038/286885a0.

Kloepper, J. W., Lifshitz, R., & Zablotowicz, R. M. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology*, *7*(2), 39-44. doi:10.1016/0167-7799(89)90057-7.

Knip, M., Constantin, M. E., & Thordal-Christensen, H. (2014). Trans-kingdom cross-talk: Small RNAs on the move. *Plos Genetics*, *10*(9): e1004602. doi:10.1371/journal.pgen.1004602.

Koberl, M., Schmidt, R., Ramadan, E. M., Bauer, R., & Berg, G. (2013). The microbiome of medicinal plants: diversity and importance for plant growth, quality and health. *Frontiers in Microbiology*, *4*, 400. doi:10.3389/fmicb.2013.00400.

Koch, A., Biedenkopf, D., Furch, A., Weber, L., Rossbach, O., Abdellatef, E., … Kogel, K.-H. (2016). An RNAi-based control of *Fusarium graminearum* infections through spraying of long dsRNAs involves a plant passage and is controlled by the fungal silencing machinery. *Plos Pathogens*, *12*(10): e1005901. doi:10.1371/journal.ppat.1005901.

Köhle, H., Jeblick, W., Poten, F., Blaschek, W., & Kauss, H. (1985). Chitosan-Elicited Callose Synthesis in Soybean Cells as a Ca^{2+} -Dependent Process. *Plant Physiology*, *77*(3), 544-551.

Krishnamurthy, S. R., Janowski, A. B., Zhao, G., Barouch, D., & Wang, D. (2016). Hyperexpansion of RNA bacteriophage diversity. *Plos Biology*, *14*(3): e1002409. doi:10.1371/journal.pbio.1002409.

Kuchitsu, K., Kosaka, H., Shiga, T., & Shibuya, N. (1995). EPR evidence for generation of hydroxyl radical triggered by N-acetylchitooligosaccharide elicitor and a protein phosphatase inhibitor in suspension-cultured rice cells. *Protoplasma, 188*(1-2), 138-142. doi:10.1007/BF01276805.

Kusaba, M. (2004). RNA interference in crop plants. *Current Opinion in Biotechnology*, *15*(2), 139-143. doi:10.1016/j.copbio.2004.02.004.

Lee, Y. A., Hendson, M., Panopoulos, N. J., & Schroth, M. N. (1994). Molecular cloning, chromosomal mapping, and sequence analysis of copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*: homology with small blue copper proteins and multicopper oxidase. *Journal of Bacteriology*, *176*(1), 173-188.

Li, R.-X., Cai, F., Pang, G., Shen, Q.-R., Li, R., & Chen, W. (2015). Solubilisation of phosphate and micronutrients by *Trichoderma harzianum* and its relationship with the promotion of tomato plant growth. *Plos One*, *10*(6): e0130081. doi:10.1371/journal.pone.0130081.

Lindow, S. E., & Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(4), 1875-1883. doi:10.1128/AEM.69.4.1875-1883.2003.

Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E. R. B., Taghavi, S., Mezgeay, M., & der Lelie, D. v. (2002). Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Science*, *21*(6), 583-606. doi:10.1080/0735-260291044377.

Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, *63*, 541-556. doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.162918.

Lundberg, D. S., Lebeis, S. L., Paredes, S. H., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S., … Dangl, J. L. (2012). Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature*, *488* (7409), 86-90. doi:10.1038/nature11237.

Maiyappan, S., Amalraj, E., Santhosh, A., & Peter, A. (2010). Isolation, evaluation and formulation of selected microbial consortia for sustainable agriculture. *Journal of Biofertilizers & Biopesticides*, *2*(2), 109. doi:10.4172/2155-6202.1000109.

Majumdar, R., Rajasekaran, K., & Cary, J. W. (2017). RNA interference (RNAi) as a potential tool for control of mycotoxin contamination in crop plants: Concepts and considerations. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 200. doi:10.3389/fpls.2017.00200.

Mallmann, W., & Hemstreet, C. (1924). Isolation of an inhibitory substance from plants. *Agricultural Research*, *28*(6), 599-602. Recuperado de https://naldc.nal.usda.gov/download/IND43966880/PDF.

Mao, Y.-B., Cai, W.-J., Wang, J.-W., Hong, G.-J., Tao, X.-Y., Wang, L.-J., … Chen, X.-Y. (2007). Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology*, *25*(11), 1307-1313. doi:10.1038/nbt1352.

Marques, M. P., Walshe, K., Doyle, S., Fernandes, P., & De Carvalho, C. C. (2012). Anchoring high-throughput screening methods to scale-up bioproduction of siderophores. *Process Biochemistry*, *47*(3), 416-421. h doi:10.1016/j.procbio.2011.11.020.

Massart, S., Martinez-Medina, M., & Jijakli, M. H. (2015). Biological control in the microbiome era: Challenges and opportunities. *Biological Control*, *89*, 98-108. doi:10.1016/j.biocontrol.2015.06.003.

Matsubara, M., Lynch, J., & De Leij, F. (2006). A simple screening procedure for selecting fungi with potential for use in the bioremediation of contaminated land. *Enzyme and Microbial Technology*, *39*(7), 1365-1372. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.04.025.

McManus, P. S., Stockwell, V. O., Sundin, G. W. & Jones, A. L. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology*, *40*, 443-465. doi:10.1146/annurev.phyto.40.120301.093927.

Meena, A. K., Verma, L., & Kumhar, B. L. (2017). RNAi, it's mechanism and potential use in crop improvement: A review. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, *5*(2), 294-311. doi:10.18782/2320-7051.2890.

Mendes, R. (2012). Microbioma da rizosfera e proteção de plantas. En Congresso Paulista de Fitopatologia 35º, *Summa Phytopathologica*, *38* (supplement). [CD-ROM]. Jaguariúna, Brasil.

Menzies, J. D. (1959). Occurrence and transfer of abiological factor in soil that suppresses potato scab. *Phytopathology*, *49*, 648-652.

Merzendorfer, H., & Zimoch, L. (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology*, *206*, 4393-4412. doi:10.1242/jeb.00709.

Minami, E., Kuchitsu, K., He, D. Y., Kouchi, H., Midoh, N., Ohtsuki, Y., & Shibuya, N. (1996). Two novel genes rapidly and transiently activated in suspension-cultured rice cells by treatment with N-acetylchitoheptaose, a biotic elicitor for phytoalexin production. *Plant and Cell Physiology*, *37*(4), 563-567.

Mishra, J., Tewari, S., Singh, S., & Kumar, N. (2015). Biopesticides: Where We Stand? En N. K. Arora (Ed.), *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets* (pp. 37-75). Nueva Delhi, India: Springer.

Mitter, N., Worrall, E. A., Robinson, K. E., Li, P., Jain, R.G., Taochy, C., … Xu, Z. P. (2017). Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. *Nature Plants, 3*(2), 1-10. doi:10.1038/nplants.2016.207.

Montesinos, E. (2003). Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *International Microbiology, 6*(4), 245-252. doi:10.1007/s10123-003-0144-x.

Moore, E. S. (1926). D'Herelle's bacteriophage in relation to plant parasites. *South African Journal of Science, 23*, 306.

Moradi, H., Bahramnejad, B., Amini, J., Siosemardeh, A., & Haji-Allahverdipoor, K. (2012). Suppression of chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Fusariums* wilt by *Bacillus subtillis* and *Trichoderma harzianum*. *Plant Omics, 5*(2), 68-74.

Moreno, C., Castillo, F., González, A., Bernal, D., Jaimes, Y., Chaparro, M., … Cotes, A. (2009). Biological and molecular characterization of the response of tomato plants treated with *Trichoderma koningiopsis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology, 74*(2), 111-120. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.00939.x.

Mulaw, T., Druzhinina, I., Kubicek, C., & Atanasova, L. (2013). Novel endophytic *Trichoderma* spp. isolated from healthy *Coffea arabica* roots are capable of controlling coffee tracheomycosis. *Diversity, 5*(4), 750-766. doi:10.3390/d5040750.

Namdeo, A. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. *Pharmacognosy Review, 1*(1), 69-79.

Napoli, C., Lemieux, C., & Jorgensen, R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell, 2*, 279-289. Recuperado de http://www.plantcell.org/content/plantcell/2/4/279.full.pdf.

Neilands, J. (1995). Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry, 270*, 26723-26726. doi:10.1074/jbc.270.45.26723.

Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K., & Ullu, E. (1998). Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 95*(25), 14687-14692.

Nielsen, P., & Sørensen, J. (1997). Multi-target and medium-independent fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology, 22*(3), 183-192. doi:10.1111/j.1574-6941.1997.tb00370.x.

Nishizawa, Y., Kawakami, A., Hibi, T., He, D.-Y., Shibuya, N., & Minami, E. (1999). Regulation of the chitinase gene expression in suspension-cultured rice cells by N-acetylchitooligosaccharides: differences in the signal transduction pathways leading to the activation of elicitor-responsive genes. *Plant Molecular Biology, 39*(5), 907-914. doi:10.1023/A:1006161802334.

Nojiri, H., Sugimori, M., Yamane, H., Nishimura, Y., Yamada, A., Shibuya, N., … Omori, T. (1996). Involvement of jasmonic acid in elicitor-induced phytoalexin production in suspension-cultured rice cells. *Plant Physiology, 110*, 387-392. doi:10.1104/pp.110.2.387.

Nongmaithem, N., Roy, A., & Bhattacharya, P. M. (2016). Screening of *Trichoderma* isolates for their potential of biosorption of nickel and cadmium. *Brazilian Journal of Microbiology, 47*(2), 305-313. doi:10.1016/j.bjm.2016.01.008.

Nowara, D., Gay, A., Lacomme, C., Shaw, J., Ridout, C., Douchkov, D., … Schweizer, P. (2010). HIGS: host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. *The Plant Cell, 22*(9), 3130-3141. Recuperado de http://www.plantcell.org/content/plantcell/22/9/3130.full.pdf.

Nunes, C. C., & Dean, R. A. (2012). Host-induced gene silencing: a tool for understanding fungal host interaction and for developing novel disease control strategies. *Molecular Plant Pathology, 13*(5), 519-529. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00766.x.

O'Sullivan, M., Stephens, P. M., & O'Gara, F. (1991). Extracellular protease production by fluorescent *Pseudomonas* spp. and the colonization of sugarbeet roots and soil. *Soil Biology & Biochemistry, 23*(7), 623-627. doi:10.1016/0038-0717(91)90074-T.

Ochoa, J. M., & Cotes, A. M. (1998). Evaluación de la actividad biocontroladora de *Pseudomonas fluorescens, Streptomyces coelicolor* y *Trichoderma hamatum* mediante su actividad individual y combinada para el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Fitopatología Colombiana, 22*, 88-93.

Ofek, M., Hadar, Y. & Minz, D. (2012). Ecology of root colonizing *Massilia* (Oxalobacteraceae). *Plos One, 7*(7): e40117. doi:10.1371/journal.pone.0040117.

Okabe, N., & Goto, M. (1963). Bacteriophages of Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology, 1*, 397-418. doi:10.1146/annurev.py.01.090163.002145.

Omnilytics. (2018). *Changing the way the world treats bacterial disease*. Recuperado de http://www.omnilytics.com/agriculture/.

Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., … Thonart, P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental*

Microbiology, *9*(4), 1084-1090. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x.

Pal-Bhadra, M., Bhadra, U., & Birchler, J. A. (1997). Cosuppression in *Drosophila*: Gene silencing of alcohol dehydrogenase by white-adh transgenes is polycomb dependent. *Cell*, *90*(3), 479-490.

Panwar, V., McCallum, B., Jordan, M., Loewen, M., Fobert, P., McCartney, C., Bakkeren, G. (2016). RNA silencing approaches for identifying pathogenicity and virulence elements towards engineering crop resistance to plant pathogenic fungi. *CAB Reviews*, *11*(027), 1-13. doi:10.1079/PAVSNNR201611027.

Pietrzak, U., & McPhail, D. C. (2004). Copper accumulation, distribution and fractionation in vineyard soils of Victoria, Australia. *Geoderma*, *122*(2-4), 151-166. doi:10.1016/j.geoderma.2004.01.005.

Pliego, C., Ramos, C., De Vicente, A., & Cazorla, F. M. (2011). Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. *Plant Soil*, *340*, 505-520. doi:10.1007/s11104-010-0615-8.

Povero, G., Loreti, E., Pucciariello, C., Santaniello, A., Di Tommaso, D., Di Tommaso, G., ... Perata, P. (2011). Transcript profiling of chitosan-treated Arabidopsis seedlings. *Journal of Plant Research*, *124*(5), 619-629. doi:10.1007/s10265-010-0399-1.

Prakash Verma, J., Yadav, J., Tiwari, K., & Jaiswal, D. (2013). Evaluation of plant growth promoting activities of microbial strains and their effect on growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in India. *Soil Biology and Biochemistry*, *70*, 33-37. doi:10.1016/j.soilbio.2013.12.001.

Qian, J., Li, D., Zhan, G., Zhang, L., Su, W., & Gao, P. (2012). Simultaneous biodegradation of Ni–citrate complexes and removal of nickel from solutions by *Pseudomonas alcaliphila*. *Bioresource Technology*, *116*, 66-73. doi:10.1016/j.biortech.2012.04.017.

Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, *34*(6), 1037-1062. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x.

Rabea, E. I., Badawy, M. E. T., Stevens, C. V., Smagghe, G., & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*, *4*(6), 1457-1465. doi:10.1021/bm034130m.

Rajasekhar, L., Satish, K., Sain, & Divya, J. (2016). Evaluation of microbial consortium for plant health management of pigeonpea. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, *6*(2), 107-113. Recuperado de http://www.ijpaes.com/admin/php/uploads/958_pdf.pdf.

Raupach, G. S., & Kloepper, J. W. (1998). Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology*, *88*(11), 1158-1164. doi:10.1094/PHYTO.1998.88.11.1158.

Raupach, G. S., Liu, L., Murphy, J. F., Tuzun, S., & Kloepper, J. W. (1996). Induced systemic resistance in cucumber and tomato against *Cucumber mosaic virus* using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Plant Disease*, *80*, 891-894. Recuperado de https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1996Articles/PlantDisease80n08_891.PDF.

Raymundo Raymundo, E., Nikolskii Gavrilov, I., Duwig, C., Prado Pano, B. L., Hidalgo Moreno, C. I., Gavi Reyes, F., & Figueroa Sandoval, B. (2009). Transporte de atrazina en un andosol y un vertisol de México. *Interciencia*, *34*(5), 330-337. Recuperado de http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33911403005.

Ren, Y.-Y., & West, C.A. (1992). Elicitation of diterpene biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) by chitin. *Plant Physiology*, *99*, 1169-1178. doi: doi:10.1104/pp.99.3.1169.

Renwick, A., Campbell, R., & Coe, S. (1991). Assessment of *in vivo* screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Pathology*, *40*(4), 524-532. doi:10.1111/j.1365-3059.1991.tb02415.x.

Roberts, D. P., & Lohrke, S. M. (2003). United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service research programs in biological control of plant diseases. *Pest Management Science*, *59*(6-7), 654-664. doi:10.1002/ps.613.

Roby, D., Gadelle, A., & Toppan, A. (1987). Chitin oligosaccharides as elicitors of chitinase activity in melon plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *143*(3), 885-892. doi:10.1016/0006-291X(87)90332-9.

Romano, N., & Macino, G. (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology*, *6*(22), 3343-3353. doi:10.1111/j.1365-2958.1992.tb02202.x.

Rose, M., Patti, A., Little, K., Brown, A. L., Jackson, W. R., & Cavagnaro, T. R. (2014). A meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances: Practical implications for agriculture. En D. L. Sparks (Ed.), *Advances in Agronomy* (1.ª ed., vol. 124, pp. 37-89). EE. UU.: Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-800138-7.00002-4.

Rothstein, S. J., DiMaio, J., Strand, M., & Rice, D. (1987). Stable and heritable inhibition of the expression of nopaline synthase in tobacco expressing antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *84*(23), 8439-8443.

Rudresh, D., Shivaprakash, M., & Prasad, R. (2005). Effect of combined application of *Rhizobium*, phosphate solubilizing bacterium and *Trichoderma* spp. on growth, nutrient uptake and yield of chickpea (*Ciceraritenium* L.). *Applied Soil Ecology*, *28*(2), 139-146. doi:10.1016/j.apsoil.2004.07.005.

Santos, A., Villamizar, L., García, M., Beltrán, C., & Cotes, A. M. (2016). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* and *Tecia solanivora* in potato seed-tuber treated with a powder formulation based on *Trichoderma koningiopsis* and baculovirus. *IOBC-WPRS Bulletin*, *115*, 47-53.

Senthilraja, G., Anand, T., Durairaj, C., Kennedy, J., Suresh, S., Raguchander, T., & Samiyappan, R. (2010). A new microbial consortia containing entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* and plant growth promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* for simultaneous management of leafminers and collar rot disease in groundnut. *Biocontrol Science and Technology*, *20*(5), 449-464. doi:10.1080/09583150903576949.

Serfling, A., Wirsel, S. G. R., Lind, V., & Deising, H. B. (2007). performance of the biocontrol fungus *Piriformospora indica* on wheat under greenhouse and field conditions. *Phytopathology*, *97*, 523-531. doi:10.1094/PHYTO-97-4-0523.

Shehata, H. R., Lyons, E. M., Jordan, K. S., & Raizada, M. N. (2016). Relevance of *in vitro* agar based screens to characterize the anti-fungal activities of bacterial endophyte communities. *BMC Microbiology*, *16*, 8. doi:10.1186/s12866-016-0623-9.

Sheng, X., Chen, X., & He, L. (2008). Characteristics of an endophytic pyrene-degrading bacterium of *Enterobacter* sp. 12J1 from *Allium macrostemon* Bunge. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *62*(2), 88-95. doi:10.1016/j.ibiod.2007.12.003.

Shoresh, M., Harman, G. E. & Mastouri, F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology*, *48*, 21-43. doi:10.1146/annurev-phyto-073009-114450.

Sindhu, S., & Dadarwal, K. (2001). Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. Cicer in chickpea. *Microbiological Research*, *156*(4), 353-358. doi:10.1078/0944-5013-00120.

Singh, A., Sarma, B. K., Upadhyay, R. S., & Singh, H. B. (2013). Compatible rhizosphere microbes mediated alleviation of biotic stress in chickpea through enhanced antioxidant and phenylpropanoid activities. *Microbiological Research*, *168*(1), 33-40. doi:10.1016/j.micres.2012.07.001.

Singh, D., Chaudhary, S., Kumar, R., Sirohi, P., Mehla, K., Sirohi, A., … Singh, P. K. (2016). RNA interference technology applications and limitations. En I. Y. Abdurakhmonov (Ed.), *RNA Interference*, InTech. Recuperado de https://www.intechopen.com/books/rna-interference/rna-interference-technology-applications-and-limitations. doi:10.5772/60631.

Skopp, J., Jawson, M., & Doran, J. (1990). Steady-state aerobic microbial activity as a function of soil water content. *Soil Science Society of America Journal*, *54*(6), 1619-1625. doi:10.2136/sssaj1990.03615995005400060018x.

Srinivasan, K., & Mathivanan, N. (2011). Plant growth promoting microbial consortia mediated classical biocontrol of sunflower necrosis virus disease. *Journal of Biopesticides*, *4*(1), 65-72. Recuperado de http://www.jbiopest.com/users/lw8/efiles/vol_4_1_241.pdf.

Stein, E., Molitor, A., Kogel, K.-H., & Waller, F. (2008). Systemic resistance in *Arabidopsis* conferred by the mycorrhizal fungus *Piriformospora indica* requires jasmonic acid signaling and the cytoplasmic function of NPR1. *Plant and Cell Physiology*, *49*(11), 1747-1751. doi:10.1093/pcp/pcn147.

Stockwell, V., Johnson, K., Sugar, D., & Loper, J. (2011). Mechanistically compatible mixtures of bacterial antagonists improve biological control of fire blight of pear. *Phytopathology*, *101*(1), 113-123. doi:10.1094/PHYTO-03-10-0098.

Summers, W. C. (2005). Bacteriophage research: early history. En E. Kutter & A. Sulakvelidze (Eds.), *Bacteriophages: Biology and applications* (pp. 5-27). Boca Ratón, EE. UU.: CRC Press.

Szittya, G., & Burgyán, J. (2013). Rna interference-mediated intrinsic antiviral immunity in plants. En B. R. Cullen (Ed.), *Intrinsic immunity* (pp. 153-181). Berlín, Alemania: Springer.

Takai, R., Hasegawa, K., Kaku, H., Shibuya, N., & Minami, E. (2001). Isolation and analysis of expression mechanisms of a rice gene, EL5, which shows structural similarity to ATL family from *Arabidopsis*, in response to N-acetylchitooligosaccharide elicitor. *Plant Science*, *160*(4), 577-583. doi:10.1016/S0168-9452(00)00390-3.

Tang, J., Liu, Y., Li, H., Wang, L., Huang, K., & Chen, Z. (2015). Combining an antagonistic yeast with harpin treatment to control postharvest decay of kiwifruit. *Biological Control*, *89*, 61-67. doi:10.1016/j.biocontrol.2015.04.025.

Tang, K., Zhang, Y., Yu, M., Shi, X., Coenye, T., Bossier, P., & Zhang, X.-H. (2013). Evaluation of a new high-throughput method for identifying quorum quenching bacteria. *Scientific Reports*, *3*, 2935. doi:10.1038/srep02935.

Tenllado, F., Llave, C., & Díaz-Ruíz, J. R. (2004). RNA interference as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants. *Virus Research*, *102*(1), 85-96. doi:10.1016/j.virusres.2004.01.019.

Tharanathan, R. N., & Kittur, F. S. (2003). Chitin—The undisputed biomolecule of great potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *43*(1), 61-87. doi:10.1080/10408690390826455.

Thayer, P. L., & Stall, R. E. (1961). A survey of *Xanthomonas vesicatoria* resistance to streptomycin. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, *1523*, 163-165. Recuperado de http://fshs.org/proceedings-o/1962-vol-75/163-165%20(THAYER).pdf.

Thomas, R. (1935). A bacteriophage in relation to Stewart's disease of corn. *Phytopathology*, *25*, 371-372.

Tian, H., Riggs, R. D., & Crippen, D. L. (2000). Control of soybean cyst nematode by chitinolytic bacteria with chitin substrate. *Journal of Nematology*, *32*(4), 370-376. Recuperado de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2620463/pdf/370.pdf.

Twort, F. W. (1915). An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet*, *186*, 1241-1243. doi:10.1016/S0140-6736(01)20383-3.

Van Buren, A. M., Andre, C., & Ishimaru, C. (1993). Biological control of the bacterial ring rot pathogen by endophytic bacteria isolated from potato. *Phytopathology*, *83*, 140-146.

Van der Krol, A. R., Lenting, P. E., Veenstra, J., van der Meer, I. M., Koes, R. E., Gerats, A. G., … Stuitje, A. R. (1988). An anti-sense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature*, *333*, 866-869. doi:10.1038/333866a0.

Van der Krol, A. R., Mur, L. A., Beld, M., Mol, J., & Stuitje, A. R. (1990). Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *The Plant Cell*, *2*(4), 291-299. Recuperado de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC159886/pdf/020291.pdf.

Vega, F. E., Goettel, M. S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M. A., Keller, S., … Roy, H. E. (2009). Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology*, *2*(4), 149-159. doi:10.1016/j.funeco.2009.05.001.

Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, E., Lorito, M., & Sivasithamparam, K. (2006). Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, *43*(2), 143-148. doi:10.1111/j.1472-765X.2006.01939.x.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Barbetti, M.J., Li, H., … Lorito, M. (2008). A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *72*(1-3), 80-86. doi:10.1016/j.pmpp.2008.05.005.

Vorholt, J. A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology*, *10*(12), 828-840. doi:10.1038/nrmicro2910.

Vranova, V., Rejsek, K., Skene, K. R., & Formanek, P. (2011). Non-protein amino acids: plant, soil and ecosystem interactions. *Plant Soil*, *342*(1), 31-48. doi:10.1007/s11104-010-0673-y.

Walker-Simmons, M., & Ryan, C. A. (1984). Proteinase inhibitor synthesis in tomato leaves: Induction by chitosan oligomers and chemically modified chitosan and chitin. *Plant Physiology*, *76*(3), 787-790. Recuperado de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1064374/pdf/plntphys00581-0243.pdf.

Wally, O. S. D., Critchley, A. T., Hiltz, D., Craigie, J. S., Han, X., Zaharia, L. I., … Prithiviraj, B. (2013a).

Erratum to: regulation of phytohormone biosynthesis and accumulation in *Arabidopsis* following treatment with commercial extract from the marine macroalga *Ascophyllum nodosum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, *32*(2), 340-341. doi:10.1007/s00344-012-9311-7.

Wally, O. S. D., Critchley, A.T., Hiltz, D., Craigie, J.S., Han, X., Zaharia, L. I., … Prithiviraj, B. (2013b). Regulation of phytohormone biosynthesis and accumulation in *Arabidopsis* following treatment with commercial extract from the marine macroalga *Ascophyllum nodosum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, *32*(2), 324-339. doi:10.1007/s00344-012-9301-9.

Wang, M., & Jin, H. (2017). Spray-induced gene silencing: a powerful innovative strategy for crop protection. *Trends in Microbiology*, *25*(1), 4-6. doi:10.1016/j.tim.2016.11.011.

Wang, M., Thomas, N., & Jin, H. (2017). Cross-kingdom RNA trafficking and environmental RNAi for powerful innovative pre-and post-harvest plant protection. *Current Opinion in Plant Biology*, *38*, 133-141. doi:10.1016/j.pbi.2017.05.003.

Wang, M., Weiberg, A., Lin, F.-M., Thomma, B. P., Huang, H.-D., & Jin, H. (2016). Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nature Plants*, *2*, 1-10. doi:10.1038/nplants.2016.151.

Weller, D. M., Raaijmakers, J. M., Gardener, B. B., & Thomashow, L. S. (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, *40*, 309-348. doi:10.1146/annurev.phyto.40.030402.110010.

Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(12), 6578-6583.

Wilson, D. (1995). Endophyte: The evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, *73*(2), 274-276. doi:10.2307/3545919.

Winterowd, J., & Sandford, P. (1995). Chitin and chitosan. En A. M. Stephen (Ed.), *Food polysaccharides and their applications* (pp. 441-462) Nueva York, EE. UU.: Marcel Dekker.

Yamada, A., Shibuya, N., Kodama, O., & Akatsuka, T. (1993). Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by N-Acetyl-chitooligosaccharides. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *57*(1), 405-409. doi:10.1271/bbb.57.405.

Yang, J., Kloepper, J. W., & Ryu, C.-M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, *14*(4), 1-4. doi:10.1016/j.tplants.2008.10.004.

Yin, H., Zhao, X., & Du, Y. (2010). Oligochitosan: A plant diseases vaccine—A review. *Carbohydrate Polymers*, *82*(1), 1-8. doi:10.1016/j.carbpol.2010.03.066.

Yu, X., Ai, C., Xin, L., & Zhou, G. (2011). The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*, *47*, 138-145. doi:10.1016/j.ejsobi.2010.11.001.

Zhang, J., Bruton, B., Howell, C., & Miller, M. (1999). Potential of *Trichoderma virens* for biocontrol of root rot and vine decline in *Cucumis melo* L. caused by *Monoporascus cannonballus*. *Subtropical Plant Science*, *51*, 29-37.

Zhu, Z., Zhang, B., Chen, B., Cai, Q., & Lin, W. (2016). Biosurfactant production by marine-originated bacteria *Bacillus subtilis* and its application for crude oil removal. *Water, Air, and Soil Pollution*, *227*(9), 328. doi:10.1007/s11270-016-3012-y.

Capítulo 21

Nuevas estrategias para el control biológico de insectos

Chapter 21

Novel strategies for insect biological control

Carlos Espinel Correal,[1] Gloria Patricia Barrera Cubillos,[1]
Lissette Aracelly Torres Torres,[1] Juliana Andrea Gómez Valderrama,[1]
Paola Emilia Cuartas Otalora,[1] Felipe Borrero Echeverry,[1]
Laura Fernanda Villamizar Rivero[2]

[1] Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA)

[2] AgResearch Ltd. Lincoln Science Centre

Contenido

Introducción 926

El uso de microesclerocios como estrategia promisoria para el control biológico 926

Nueva estrategia para el control de plagas basado en silenciamiento génico 929

- ARN interferente 929

Uso de metabolitos como potenciadores de la actividad biológica 932

- Quitinasas 933
- Proteínas derivadas de baculovirus 934
- Toxinas 935

Combinación de microorganismos en el control de insectos plaga 936

- Hongos entomopatógenos con otros microorganismos 936
- Coinfecciones virales: virus - virus 938

Conclusiones y perspectivas 943

Agradecimientos 943

Referencias 944

Resumen

Muchos insecticidas de síntesis química se han convertido en un método insostenible para el manejo de insectos plaga, mientras que los bioplaguicidas a base de microorganismos entomopatógenos han emergido en las últimas décadas como una alternativa para la agricultura sostenible. En el presente capítulo se mostrará el uso de entomopatógenos que podrían estar involucrados en el desarrollo de bioinsecticidas de nueva generación. Se mostrarán los avances hechos con el aprovechamiento de microesclerocios como estructuras de resistencia y una forma novedosa de producción y de liberación de propágulos en el campo. Se mencionarán las ventajas y el camino por recorrer al utilizar la estrategia de silenciamiento génico que aprovecha el desarrollo de las ómicas como nuevas tecnologías en biología molecular. De igual forma, se abordará otra estrategia promisoria, que es el uso de metabolitos como potenciadores de la actividad biocontroladora, como toxinas, quitinasas o de proteínas derivadas de baculovirus. La estrategia de combinación de microorganismos que aprovechan eventos de sinergismo, adición o de coinfección es la que lleva más tiempo de uso, sin embargo, aún falta por conocer mayores detalles al respecto y, por ende, sigue teniendo un gran potencial si se aprovechan todos los atributos que pueden tener los microorganismos evaluados.

Palabras clave

Control biológico, coinfección, entomopatógenos, esclerocio, silenciamiento génico

Abstract

Most chemical synthesis insecticides have become an unsustainable method to control insect pests. Biopesticides based of entomopathogens microorganisms have emerged as an alternative for a sustainable agriculture in the past decades. This chapter will discuss different strategies that might be used in the development of next generation biopesticides. In order to provide resistance against abiotic factors, and as a novel method for the production and release of propagules, microsclerotia are being developed. From a molecular standpoint, the advantages and perspectives of gene silencing, taking advantage of the "omics", will be explored. Another promising strategy involves enhancing the activity of biopesticides by reducing lethal doses, decreasing the time they require to kill insects, or increase the species range they affect. One alternative is the use of metabolites such as toxins, enzymes or baculovirus-derived proteins as additives. Alternately, combining microorganisms to take advantage of synergism, additive effects or coinfection, is currently the most used strategy to enhance biopesticide activity, however, it remains understudied and its full potential has yet to be taken advantage of.

Keywords

Biological control, co-infection, entomopathogens, gen silencing, sclerotia

Introducción

En los capítulos anteriores hemos hecho un recorrido por las estrategias de control biológico de insectos con diferentes microorganismos (hongos, bacterias, virus) como principio activo de las plagas blanco. Sin embargo, han sido usados de la manera "tradicional" mediante la aplicación del microorganismo en forma individual, enfrentados a todas las condiciones bióticas y abióticas que puedan experimentar y que en capítulos pasados se han mencionado. Además, muchos otros factores pueden amenazar el éxito de esta estrategia, tales como la conversión de hábitats no especializados en agricultura a otros estrictamente agrícolas, lo que reduciría el éxito reproductivo de los agentes de control y su capacidad de dispersión en el nuevo ambiente. El cambio climático, las modificaciones en la sincronía entre el entomopatógeno y el hospedero, las invasiones de nuevas especies o el resurgimiento de especies plaga secundarias y la reducción de la biodiversidad también pueden influenciar en el éxito del control microbiológico.

Por tal razón, en este capítulo nos centraremos en algunas estrategias que se podrían considerar novedosas desde la visión tradicional para atacar el problema de los insectos plaga. Estas comprenden desde la producción, el manejo y el sistema de entrega al ambiente hasta el aprovechamiento de otros compuestos que contribuyan a dar un valor agregado al producto final. En este mundo de cambios tan rápidos, muchas estrategias mencionadas han tenido mayor oportunidad de desarrollo e implementación con sus variantes, pero hay otras que hasta estos últimos años se han empezado a trabajar, y a medida que se han abierto puertas u obtenido respuestas se van encontrando nuevos retos o preguntas por resolver. Son, entonces, algunas de estas opciones, apuestas con miras a resolver problemas de origen antiguo, pero con nuevos retos como fruto del avance de la frontera del conocimiento y de los inexorables cambios de nuestro entorno.

El uso de microesclerocios como estrategia promisoria para el control biológico

La estabilidad de los propágulos fúngicos en el ambiente se ve afectada por factores bióticos y abióticos como la temperatura, la radiación solar, el pH y la desecación (Lingg & Donaldson, 1981). Las estructuras fúngicas más utilizadas como ingrediente activo de bioproductos para el control de insectos plaga y enfermedades son los conidios. Los conidios son esporas asexuales y son responsables de la actividad biocontroladora. Estos propágulos se dispersan en el medio ambiente gracias a las corrientes del viento, el movimiento del agua y los insectos, entre otros. La producción masiva de conidios se realiza principalmente mediante procesos de fermentación sólida y bifásica (líquido-sólido) utilizando diferentes sustratos sólidos de origen vegetal que son, generalmente, de tipo lignocelulósicos con variable contenido de almidón (Prabhakar, Krishnaiah, Janaun, & Bono, 2005). Los sustratos naturales presentan algunas desventajas: la principal es que la fuente de carbono hace parte de la estructura; cuando el microorganismo crece, el medio sólido se degrada y cambia sus características físicas, como la porosidad, y, en la mayoría de los casos, su capacidad de transferir calor y masa se reduce (Barrios-González, 2012; Barrios-González & Mejía, 1996; Manpreet, Sawraj, Sachin, Pankaj, & Banerjee, 2005). El escalamiento de los procesos de fermentación sólida es difícil de implementar, debido a que presenta problemas en el control de la temperatura, la transferencia de oxígeno, el pH y la humedad (gradientes) (Dos Santos, Da Rosa, Dal'Boit, Mitchell, & Krieger, 2004; Maurel, Orliaca & Christen, 2003); además, son altamente demandantes de mano de obra y generan grandes volúmenes de desechos sólidos, de manera que estos

problemas impactan negativamente la factibilidad técnica y económica de diferentes bioinsumos a base de conidios.

Una estructura reproductiva asexual alternativa a los conidios son los esclerocios, los cuales se caracterizan por ser partículas sólidas, compactas y de forma y tamaño relativamente regular, capaces de sobrevivir por largos períodos de tiempo en estado de latencia (Willetts, 1971). Los esclerocios se forman a partir de una masa de hifas que se empaca y compacta, y se diferencian como agregados de tejido que madura y se melaniza. Estas estructuras ayudan a los hongos a sobrevivir en condiciones adversas como el congelamiento, la desecación y la ausencia de hospederos. El tamaño de los esclerocios es muy variable, depende de la especie fúngica y las condiciones durante su formación, y pueden medir varios milímetros o ser de tamaño micrométrico; en el segundo caso se denominan *microesclerocios* (Smith, Henkel, & Rollins, 2015). Los microesclerocios (MS) son estructuras comunes en varios hongos fitopatógenos, como en el caso de *Verticillium albo-atrum*, cuyos microesclerocios son altamente persistentes en el ambiente y sobreviven en el suelo entre 6 y 12 años (Huisman & Ashworth, 1976, citado por Goble, Gardescu, Fisher, Jackson, & Hajek, 2016). Aunque esta estructura ha sido conocida y estudiada para diferentes patógenos vegetales, fue solo recientemente que se describió para algunos hongos entomopatógenos, como *Metarhizium anisopliae* (Jackson & Jaronski, 2009; Jaronsky & Jackson, 2008), *Metarhizium brunneum* (Behle & Jackson, 2014), *Nomuraea rileyi*, ahora reclasificado como *Metarhizium rileyi* (Song et al., 2013), *Purpureocillium lilacinum* (Song, Shen, Zhong, Yin, & Wang, 2016) y el hongo antagonista *Trichoderma harzianum* (Kobori, Mascarin, Jackson, & Schisler, 2015).

La producción masiva de microesclerocios (MS) de hongos biocontroladores se realiza en cultivo sumergido, donde la relación carbono-nitrógeno del medio juega un papel fundamental, aunque el tiempo de fermentación se considera el parámetro crítico en términos de la formación de estas estructuras, su endurecimiento y su melanización (Jackson & Jaronski, 2012). Los tiempos de fermentación reportados para la producción de microesclerocios de diferentes hongos benéficos oscilan entre cuatro y siete días (Jackson & Jaronski, 2012; Kobori et al., 2015; Song et al., 2013); la formación se inicia a partir del segundo día, con su subsecuente crecimiento, compactación y melanización durante los siguientes días (Jackson & Jaronski, 2012). Los rendimientos han sido variables, con valores entre 2,6 - 4,2 × 10^4 MS mL^{-1} para *M. brunneum* (Jackson & Jaronski, 2012), 1,5 - 2,5 × 10^4 MS mL^{-1} para *T. harzianum* (Kobori et al., 2015), 3,84 × 10^4 y 2,1 × 10^5 MS mL^{-1} para *M. rileyi* (Song, Lin, Du, Yin & Wang, 2017; Song et al., 2013) y 1,1 × 10^5 MS mL^{-1} para *P. lilacinum* (Song et al., 2016).

Bajo condiciones adecuadas de humedad y temperatura, los microesclerocios germinan, producen micelio y posteriormente esporulan produciendo conidios (figura 21.1), por lo que la utilización de microesclerocios de hongos entomopatógenos y antagonistas se perfila como una estrategia factible e innovadora para la liberación de propágulos fúngicos que posteriormente producen una cantidad importante de inóculo infectivo.

Los MS han sido principalmente formulados como gránulos y utilizan diferentes soportes sólidos, como caolín, celulosa y tierra de diatomeas (Goble et al., 2016); este último es el más empleado. Para formulación de pequeños volúmenes, el protocolo descrito por Kobori et al. (2015) consiste en adicionar 5 g de tierra de diatomeas a 100 mL de cultivo líquido una vez terminada la fermentación. La mezcla se filtra al vacío y la torta obtenida se quiebra, se distribuye en la superficie de una placa y se seca toda la noche con aire a 22 °C hasta humedades inferiores al 5 %.

Formulaciones de microesclerocios de diferentes hongos han sido evaluadas a nivel de laboratorio y campo para el control de algunas plagas y enfermedades. Por ejemplo, Goble et al. (2016) estudiaron la producción de conidios, la persistencia y la patogenicidad de microesclerocios de *M. brunneum* F52 en una formulación líquida para el control del escarabajo asiático de los cuernos (*Anoplophora glabripennis*) en cultivos forestales. En este trabajo los microesclerocios formulados produjeron conidios infectivos durante 30 días en condiciones de campo y la producción se vio positivamente influenciada por la alta humedad relativa, la alta temperatura y los períodos de lluvia. Los conidios producidos por los microesclerocios en el campo fueron evaluados en condiciones de laboratorio y evidenciaron alta patogenicidad, con tiempos letales medios entre

Fotos: Laura Fernanda Villamizar

Figura 21.1. Microesclerocios de *Beauveria pseudobassiana*. a. Microesclerocio; b. Microesclerocio germinado; c. Conidiación a partir de microesclerocio germinado.

15,5 y 21,5 días sobre hembras adultas de la plaga. Behle, Richmond, Jackson y Dunlap (2015) evaluaron los microesclerocios de este mismo aislamiento de *M. brunneum* F52 para el control de larvas del escarabajo japonés (*Popillia japonica*) en condiciones de laboratorio y campo en cultivos de pastos. Los microesclerocios se utilizaron en formulación líquida y en gránulos y se compararon con formulaciones comerciales de conidios de este mismo hongo y con los insecticidas químicos Imidacloprid y Trichlorfon. Las formulaciones del hongo redujeron significativamente la densidad de larvas en comparación con el control no tratado, con niveles de control entre 38,6 % y 69,2 %, que en algunos casos resultaron similares a los obtenidos con los agroquímicos evaluados. La formulación en gránulos fue también evaluada por Behle, Jackson y Flor-Weiler (2013) para el control de ninfas de la garrapata *Ixodes scapularis*. En dicho trabajo, se determinó que los microesclerocios aplicados sobre mezcla para macetas mantenidos bajo condiciones controladas fueron capaces de producir conidios durante dos semanas y los conidios permanecieron viables por ocho semanas después de la aplicación. Las ninfas fueron susceptibles a la infección y se alcanzaron mortalidades entre el 56 % y el 74 %.

En otra investigación, los microesclerocios del hongo biocontrolador de fitopatógenos *Trichoderma harzianum* fueron también producidos en fermentación líquida y evaluados para el control del *damping off* causado por *Rhizoctonia solani* en semilleros de melón (Kobori et al., 2015). La incorporación de gránulos en el suelo mejoró la emergencia de plantas y redujo en un 90 % la incidencia de la enfermedad, incrementando así la sobrevivencia de las plantas de melón. Esta formulación demostró además una alta estabilidad, ya que mantuvo la misma producción de conidios por gramo de granulado después de 12 meses de almacenamiento a temperatura ambiente (Kobori et al., 2015).

En conclusión, los microesclerocios de los hongos biocontroladores son una estructura con alto potencial para el desarrollo de una nueva generación de bioproductos. Se trata, entonces, de un ingrediente activo tolerante a condiciones de estrés como la desecación, con alta persistencia en campo y con capacidad de multiplicarse, producir y liberar grandes cantidades

de propágulos activos en el ambiente. Además, tiene ventajas adicionales, como la facilidad para producirlos en sistemas de fermentación líquida utilizando medios de cultivo simples y económicos, que además pueden ser fácilmente estandarizados, escalados y controlados para obtener altos rendimientos y reproducibilidad entre lotes de producción. Aunque por ser estructuras de resistencia es posible que no requieran el desarrollo de formulaciones de alta complejidad, es importante el desarrollo de formulaciones adecuadas con algunos adyuvantes y fuentes nutricionales que podrían mejorar el desempeño ecofisiológico de los microesclerocios en campo. A pesar de las ventajas de estas estructuras, actualmente son pocos los trabajos desarrollados sobre producción, formulación y evaluación de formulados a base de microesclerocios, que son una herramienta novedosa que podría remplazar los bioproductos fúngicos a base de conidios, blastosporas o micelio.

Nueva estrategia para el control de plagas basado en silenciamiento génico

Para el control de insectos plaga se han desarrollado diversas estrategias que incluyen el uso de insecticidas de síntesis química y organismos vivos presentes en el medio ambiente (Mazid, 2011). Una nueva generación de controladores biológicos se basa en la combinación de moléculas, metabolitos secundarios y otros adyuvantes que mejoran las características insecticidas. Con el desarrollo de nuevas tecnologías en biología molecular (ómicas) se generó un auge de nuevas y revolucionarias estrategias para el control de plagas. Es así que se ha identificado una gran variedad de proteínas con acción insecticida y se introdujo el concepto de *plantas resistentes* que expresan estas proteínas en las denominadas *plantas transgénicas*. Sin embargo, esta estrategia no ha sido infalible y se han desarrollado resistencias de algunos insectos, por lo cual la búsqueda de nuevas formas de control con nuevos modos de acción es constante.

ARN interferente

El descubrimiento de un mecanismo de silenciamiento génico denominado ARN *interferente* (ARNi) dio inicio al desarrollo de una nueva generación de aplicaciones para el control de insectos plaga. El mecanismo de ARNi es empleado de manera natural por organismos eucariotas para la regulación de la expresión génica, el reordenamiento genómico y la defensa contra ácidos nucleicos foráneos (Carthew & Sontheimer, 2009; Perrimon, Ni, & Perkins, 2010). El ARNi funciona como un "silenciador de genes" específico de secuencia de ARN, el cual genera la degradación o, en algunos casos, la inhibición de la traducción del ARN blanco (Fire et al., 1998).

Las primeras observaciones de este mecanismo de silenciamiento se realizaron con el gen en la enzima nopalina sintasa (NOS) en plantas de tabaco (Rothstein, DiMaio, Strand, & Rice, 1987) y posteriormente se definieron las características moleculares del proceso de interferencia mediante la aplicación de ARN de doble cadena (ARNdc) exógeno en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, el cual silenció un ARNm endógeno y se denominó ARN *interferente* (Fire et al., 1998). En este sistema se describió que moléculas de ARNdc con secuencia específica de un gen blanco pueden ingresar por el tracto digestivo del nematodo e inducir la disminución de su transcripción (Timmons, Court, & Fire, 2001). Debido a que el silenciamiento de genes bajo este mecanismo es conservado en células eucariotas (Fire, 2007), se convirtió en una herramienta fundamental para estudios de genómica funcional en insectos. La descripción del funcionamiento general del mecanismo se muestra en el capítulo 20, "Nuevas estrategias para el control de fitopatógenos ".

En resumen, el mecanismo de ARN interferente en insectos involucra una enzima denominada *Dicer* (del tipo RNasa III), la cual rompe las moléculas de ARNdc en secuencias más pequeñas (21-24 pares de bases) denominadas *siARN* o *miARN*, según su biogénesis; estas son incorporadas en un complejo con múltiples subunidades denominado RISC (del inglés *RNA-induced silencing complex*), que realiza el silenciamiento identificando y capturando ARNm citoplasmático

complementario para evitar su transcripción. Aunque en plantas, nematodos y hongos se describió la acción de un ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP) para amplificar el mecanismo de interferencia mediante la formación de nuevas moléculas de siARN, en insectos esta enzima no tendría homólogos (Gordon & Waterhouse, 2007), por lo tanto, podrían existir mecanismos análogos para esta función, los cuales son de vital importancia para que el silenciamiento sea sistémico en insectos.

ARN interferente en el control de plagas

La investigación en ARN interferente en el campo de la entomología ha demostrado ser útil en el estudio de la función, la regulación y la expresión de genes, con modelos como *Drosophila melanogaster*, *Tribolium castaneum* y *Bombyx mori* (Arakane, Specht, Kramer, Muthukrishnan, & Beeman, 2008; Hossain et al., 2008; Miller, Brown, & Tomoyasu, 2008). En diversos trabajos se emplea esta tecnología para analizar genes involucrados en el desarrollo, en aspectos fisiológicos generales, en la reproducción, en el comportamiento y en las vías biosintéticas de los insectos. Esta aplicación también se enfoca al desarrollo de alternativas de control de plagas buscando genes específicos para bloquear el desarrollo, la reproducción u otros que sean vitales en la supervivencia del insecto (De Andrade & Hunter, 2016).

Teniendo en cuenta que la molécula desencadenante del mecanismo ARNi es el ARNdc, los primeros trabajos en control se basaron en el desarrollo de plantas transgénicas que expresan este tipo de moléculas con secuencia complementaria a genes blanco de insectos. Así, las moléculas pioneras se realizaron sobre la subunidad A del gen de ATPasa (V-ATPasa) y el gen de citocromo P450 (CYP6AE14) para control de *Diabrotica virgifera virgifera* Leconte (Coleoptera: Chrysomelidae) y *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) (Baum et al., 2007; Mao et al., 2007). Estos trabajos introdujeron el mecanismo de RNAi inducido por el hospedero en insectos (HI-RNAi, del inglés *host-induced RNAi*) para su control (Gordon & Waterhouse, 2007), donde el insecto consume parte de la planta para adquirir el ARNdc, el cual, en el intestino, induce el mecanismo que silencia el gen. Mamta y Rajam (2017) publicaron una tabla resumen de los desarrollos de HI-RNAi para el control de plagas.

Posteriormente se introdujo el concepto de ARNi ambiental, en el cual el mecanismo de ARNi es inducido después de la exposición del insecto al ARNdc por administración oral o tópica (Kupferschmidt, 2013). A partir de allí se han publicado un gran número de trabajos encaminados al desarrollo de una alternativa de control biológico basado en ARNi, que sea específica y evite daños colaterales del ecosistema.

Selección del gen blanco y producción de ARNdc

Los genes candidatos para el desarrollo de ARNi son aquellos de función conocida. Se han empleado genes de enzimas detoxificantes, síntesis celular, nutrición, metabolismo y citoesqueleto, los cuales han sido seleccionados con base en diferentes tecnologías denominadas *ómicas*, incluyendo librerías EST (del inglés *expressed sequence tags*) y RNAseq para la caracterización de transcriptomas, entre otros. La selección puede estar basada en genes muy específicos o de amplio espectro, dependiendo de la variabilidad de la región genómica empleada. La mayor especificidad se logra sobre regiones UTR (del inglés *untranslated region*) (Whyard, Singh, & Wong, 2009); por el contrario, genes como V-ATPasa pueden tener efecto sobre *B. tabaci*, *D. virgifera virgifera* y *B. dorsalis* (Thakur, Mundey, & Upadhyay, 2016). Además, para ampliar el espectro de la estrategia ARNi también se pueden utilizar mezclas de ARNdc dirigidas contra diferentes especies de insectos (Thakur et al., 2016).

La síntesis de las cadenas de ARNdc (sentido y antisentido) se puede realizar por vía enzimática *in vitro*, o pueden ser clonadas de manera independiente en un plásmido bajo el promotor del bacteriófago T7. Los plásmidos se alinean con enzimas de restricción y se transcriben de manera independiente utilizando la ARN polimerasa T7. En cualquiera de los dos casos, las cadenas sencillas de ARN se mezclan en concentraciones equimolares y se anillan por complementariedad para generar el ARNdc (Kontogiannatos et al., 2013). Una

manera de producir ARNdc a mayor escala es mediante la transformación de células de *E. coli* usando una cepa deficiente en ARNasaIII, conocida como HT115 (DE3), así la producción del plásmido que contiene el inserto del gen de interés se produce después de la inducción con IPTG (isopropylthio-β-galactoside), dado que las unidades transcripcionales que generarán el ARNdc están reguladas por el operador y represor Lac (Tenllado, Martínez-García, Vargas, & Díaz-Ruíz, 2003).

Vías de administración del ARNdc

Existen diversas posibilidades para administrar el ARNdc que desencadena el mecanismo de ARNi en el control de insectos. Para efectos de investigación, se ha probado la inyección del ARNdc en el hemocele del insecto, su aplicación en dietas sintéticas o por alimentación en gota; sin embargo, para el desarrollo de una estrategia de control aplicable a campo, estas metodologías no son factibles (Thakur et al., 2016). Para ello, se han estudiado formas de administración oral bajo diferentes estrategias, como las plantas hospederas transgénicas que expresen moléculas de ARNdc o la aplicación directa de las moléculas (figura 21.2). Por otra parte, se han realizado estudios con virus infectivos (baculovirus recombinantes) que pueden expresar ARNdc. Hajos et al. (1999) describieron el uso del nucleopoliedrovirus de *Autographa californica* (AcMNPV) que expresa ARNdc dirigido contra la hormona juvenil esterasa (JHE) bajo el promotor p10 para el control de *Chloridea (Heliothis) virescens*.

Se han descrito diversas formas posibles para aplicar el ARNdc, incluyendo cebos, aerosoles, sistemas de riego, etc. Las formulaciones permiten proteger las moléculas de ARNdc para prevenir la degradación y aumentar su posibilidad de ingreso en el sistema celular del insecto blanco. Dentro de las estrategias

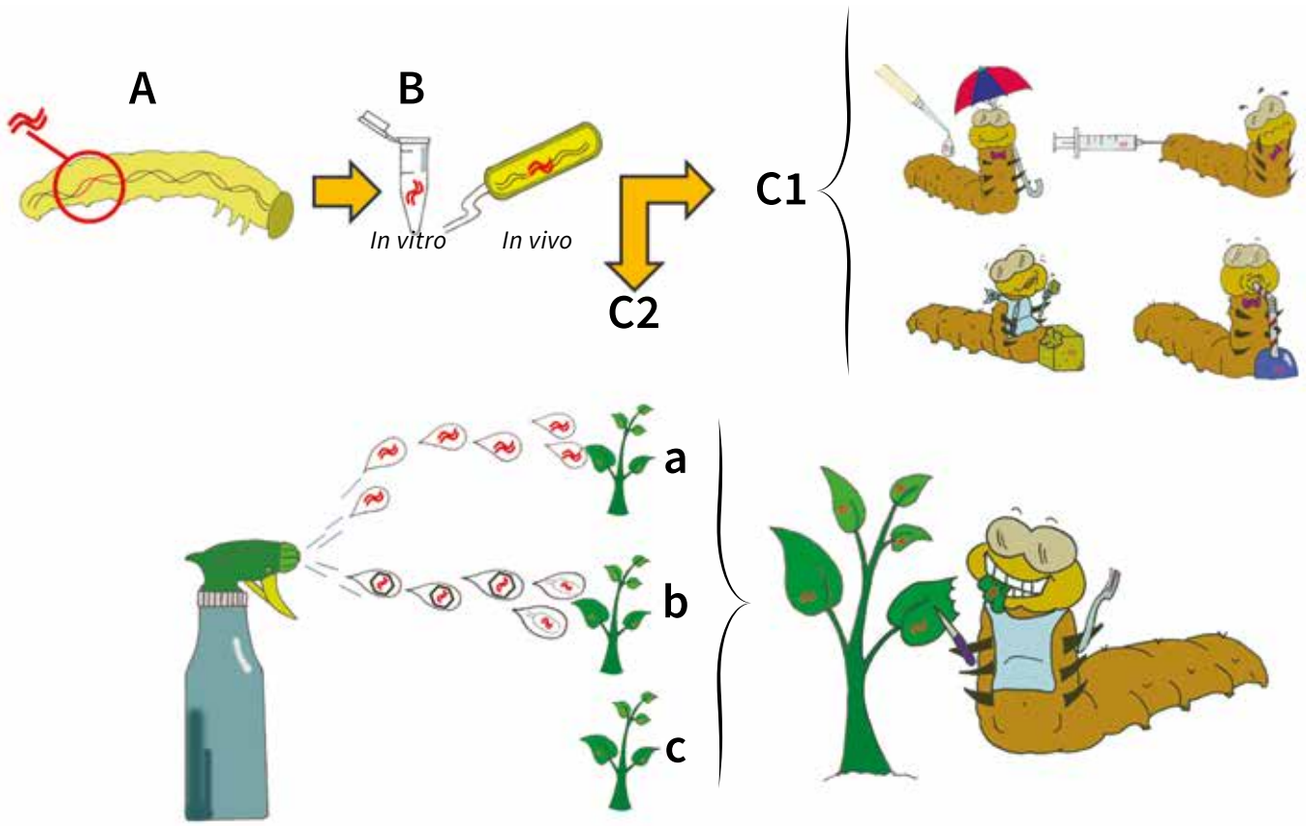


Figura 21.2. Esquema de la estrategia de control de insectos plaga mediante ARNi. A. Selección del gen blanco; B. Producción de moléculas desencadenantes; C. Vías de aplicación; C1. Métodos utilizados en laboratorio: aplicación tópica e inyectada y aplicación oral mediante dietas artificiales y método de la gota; C2. Estrategias de liberación en campo; C2a. Aplicación de moléculas desencadenantes formuladas; C2b. Aplicación a través de vectores (bacterias y virus); C2c. Uso de plantas hospederas transgénicas.

Fuente: Elaboración propia

utilizadas se encuentran: el recubrimiento en liposomas (Whyard et al., 2009) y nanopartículas de quitosán (Zhang, Zhang, & Zhu, 2010) para proteger de condiciones ambientales; también se han usado péptidos denominados *CPP* (del inglés *cationic cell-penetrating peptides*) que pueden proteger las moléculas de la degradación endosomal y entregar la carga directamente en la célula (Endoh & Ohtsuki, 2009).

Eficacia del control de plagas mediado por ARNi

La eficacia del control mediado por ARNi es variable entre diferentes grupos de insectos, posiblemente por diferentes factores inherentes a la especie en cuestión. A pesar de diversos estudios en diferentes órdenes de insectos como Coleoptera, Hemiptera, Orthoptera, Hymenoptera, Lepidoptera y Diptera, los dos últimos parecen tener menor susceptibilidad al mecanismo ARNi (Thakur et al., 2016).

En algunos casos, existen limitantes como la degradación rápida de las moléculas de ARNdc, ineficientes formas de internalización de las moléculas en la célula o baja presentación y subsecuente interacción con la maquinaria del mecanismo de interferencia. Además, se tienen reportes que demuestran que el pH y las enzimas intestinales pueden degradar el ARNdc antes de internalizarse en las células (Garbutt, Bellés, Richards, & Reynolds, 2013; Hakim, Baldwin, & Smagghe, 2010). En este sentido, se han descrito ejemplos en los que se demuestran las causas de variabilidad en la eficiencia del mecanismo ARNi en diferentes grupos de insectos (Ivashuta et al., 2015; Shukla et al., 2016; Wang et al., 2016).

Otros factores que determinan el éxito de la estrategia de ARNi incluyen la dosis empleada para la inducción del mecanismo, donde algunos insectos responden a altas dosis y otros pueden ser sobresaturados, lo cual inhibe la maquinaria y la eficiencia del control (Garbutt et al., 2013). Por otra parte, la longitud de las moléculas también puede ser un factor decisivo de éxito y varía entre diferentes especies de insectos (Bolognesi et al., 2012), donde se han descrito fragmentos entre 134 y 1.842 pb, con un rango frecuente entre 300 y 500 pb (Scott et al., 2013).

El ARNdc producido *in vitro* mediante un sistema enzimático o producido de manera recombinante en bacterias transformadas puede ser considerado como un producto natural (bioplaguicida), ya que su mecanismo de acción se presenta de manera natural. Esta tecnología, como la mayoría de los plaguicidas biológicos, puede ser menos efectiva que los plaguicidas químicos; sin embargo, es aplicable en combinación con otras estrategias para evitar el desarrollo de resistencias e inclusive para disminuir el impacto ambiental que puede generar el control químico convencional vía reducción de dosis (Kourti, Swevers, & Kontogiannatos, 2017). Por otra parte, la aplicación de ARNi puede ser utilizada como sinergista para aumentar el efecto de otros bioplaguicidas. Otro factor importante para el desarrollo de ARNi como controlador biológico son los costos de producción, ya sea por vía síntesis enzimática o bacteriana. Para ensayos de laboratorio es posible producir bajas cantidades; sin embargo, la producción a gran escala aún no es viable (Palli, 2014). A pesar de ello, los costos han ido descendiendo rápidamente: mientras en 2008 se estimaba el costo de 40 g de ARNdc en 500.000 dólares, para el 2016 los costos estimados para la misma cantidad fueron de 4.000 dólares (De Andrade & Hunter, 2016).

Uso de metabolitos como potenciadores de la actividad biológica

En Colombia, el uso de agentes de control biológico (ACB) ha venido tomando fuerza en los últimos años debido a la concientización de los agricultores respecto a la aplicación indiscriminada de agroquímicos y sus consecuencias para la salud y el medio ambiente, a la aparición de resistencia por parte de las plagas y a las restricciones del mercado internacional frente a los límites de residuos de plaguicidas en los productos de importación.

Numerosos esfuerzos se han realizado por parte de las universidades, las organizaciones científicas y los gremios para desarrollar productos biológicos de alta calidad, que sean rentables para los productores y que tengan igual o mayor eficacia que los agroquímicos. Los productos entomopatógenos más comúnmente empleados tienen como principio activo hongos (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii*, entre otros), bacterias (*Bacillus thuringiensis*) y, minoritariamente, virus (baculovirus). Sin embargo, una de sus grandes limitantes es el tiempo entre su aplicación y la muerte de los insectos, el cual suele ser de varios días, además de requerir, en algunos casos, dosis altas para evidenciar una eficacia aceptable, lo cual puede aumentar los costos.

Gracias al amplio conocimiento que hoy se tiene respecto a estos organismos, es posible mejorar y potenciar su uso mediante el aprovechamiento de sus genes de virulencia y del rol biológico que desempeñan en la patogénesis. Los modos de acción químicos o bioquímicos toman entonces gran importancia en el desarrollo de bioplaguicidas eficaces. La investigación actual y futura sobre bioplaguicidas se beneficiaría de un enfoque intensificado en la química, que tomara en cuenta no solo la acción del microorganismo *per se* sino que integrara una visión holística desde múltiples frentes y mecanismos de acción (Hubbard, Hynes, Erlandson, & Bailey, 2014). Una comprensión más completa de la base química del control biológico de plagas puede facilitar el desarrollo de bioplaguicidas de nueva generación mediante el uso combinado de agentes de control biológico con diferentes metabolitos bioactivos que mejoren las características insecticidas del producto, ya sea disminuyendo su concentración o tiempo letal o ampliando el rango de hospederos sobre los cuales tiene efecto. Dichas estrategias se han investigado, ya sea mediante la manipulación genética de los organismos o como aditivos funcionales (Ortiz-Urquiza, Luo, & Keyhani, 2015).

Los metabolitos bioactivos más ampliamente estudiados han sido las enzimas obtenidas de los hongos entomopatógenos. La penetración de los hongos en la epicutícula de los insectos depende de factores físicos y químicos influenciados por la composición y la maquinaria enzimática de los hongos. Dicha maquinaria incluye la producción de quitinasas, proteasas, lipasas y esterasas, entre otras (Hubbard et al., 2014; Khachatourians, 1996).

Otra estrategia que se ha estudiado es el uso de toxinas específicas para insectos (insectotoxinas). Muchos animales, particularmente las arañas y los escorpiones, han desarrollado neurotoxinas que afectan únicamente el sistema nervioso de sus presas, paralizándolas y luego matándolas. Por tal razón estas moléculas tienen un gran potencial para el control de insectos plaga (Gurevitz et al., 2007; Harrison & Booning, 2001; Rohou, Nield, & Ushkaryov, 2007).

Quitinasas

Las quitinasas son enzimas que han sido detectadas en una gran variedad de organismos, incluyendo los hongos, y que intervienen en la degradación de la quitina presente en el exoesqueleto y en los revestimientos intestinales de los insectos (Zhiqiang, 2005). Debido a la importancia de la quitina y sus enzimas metabólicas en el crecimiento y el desarrollo de los insectos, las enzimas quitinolíticas y sus genes han recibido mucha atención en los últimos años. Este interés se basa en el hecho de que las quitinasas pueden participar como agentes de defensa frente a insectos plaga y patógenos porque degradan estructuras vitales como la membrana peritrófica, la cutícula de los insectos, los huevos, la pared celular de patógenos fúngicos, o por liberación de moléculas que posteriormente provocan otros tipos de respuestas defensivas por parte del hospedero (Herrera-Estrella & Chet, 1999). Tanto los hongos como las bacterias y los virus entomopatógenos poseen genes que codifican para la producción de quitinasas, y se ha demostrado que, en los procesos infectivos, estas perforan la membrana del intestino de los insectos, facilitando la entrada de los patógenos a la cutícula del insecto y permitiendo así la penetración de los hongos (Singh et al., 2014).

Dada la importancia de las quitinasas tanto en el control de insectos como en la resistencia a enfermedades, se han clonado numerosos cDNA de quitinasas provenientes de plantas o de microorganismos y algunos se han introducido en plantas bajo el control de promotores constituyentes, lo cual ha dado como resultado una mejora de la resistencia de la planta a hongos fitopatógenos (Herrera-Estrella & Chet, 1999). En el caso de los insectos existe menos información al respecto, con muy pocos casos de éxito

reportados. Osman et al. (2015) aislaron un gen de quitinasa proveniente del insecto *Spodoptera littoralis* y desarrollaron plantas de maíz que expresaban esta enzima. Los bioensayos realizados revelaron que se presentó más de un 60 % de mortalidad de larvas de *Sesamia cretica* cuando estas fueron alimentadas en el maíz transgénico. Esta estrategia, sin embargo, debe estudiarse más a fondo. Es por esto que el estudio del uso combinado de entomopatógenos y quitinasa surge como una estrategia innovadora para el desarrollo de bioplaguicidas.

Quitinasas como sinergistas de microorganismos: caso *Bacillus thuringiensis* (Bt)

Las quitinasas microbianas se han utilizado en experimentos de mezclas para aumentar la potencia de microorganismos entomopatógenos. Dichos efectos sinérgicos se describieron desde los años setenta, en donde se usaron enzimas quitinolíticas bacterianas para potenciar la actividad de la bacteria *B. thuringiensis* (Kramer & Muthukrishnan, 1997). Se observó un efecto letal mayor sobre larvas de *S. littoralis* cuando se incorporó una combinación de bajas concentraciones de una toxina Bt recombinante (Cry1C) y una endoquitinasa de *Serratia marcescens* en la dieta de los insectos (Regev et al., 1996). La mezcla de una cepa de Bt con baja actividad quitinolítica con cepas de Bt con alta producción de quitinasas resultó en una menor concentración letal media que la cepa inicial sobre larvas de *Spodoptera exigua* (Liu et al., 2002). En otro estudio, se purificó una quitinasa a partir del sobrenadante del medio de cultivo de la cepa de Bt HD-1. Dicha proteína potenció el efecto insecticida de la proteína Vip cuando se utilizó contra larvas neonatas de *Spodoptera litura* y redujo su concentración letal en un 30 % (Arora, Ahmad, Rajagopal, & Bhatnagar, 2003). Incluso se modificó genéticamente una cepa de Bt nativa a la que se le incluyó un gen que codifica para la quitinasa chiBlA de *Bacillus licheniformis* por recombinación homóloga y se demostró que se redujo más del 50 % la concentración letal 90 de la cepa Bt sobre larvas de *S. exigua*. Además, utilizando microscopía electrónica de barrido, se observaron perforaciones en la membrana peritrófica de larvas que fueron alimentadas con quitinasas crudas o purificadas desde el primer instar (Thamthiankul, Moar, Miller, & Panbangred, 2004). Los estudios descritos demuestran el potencial de emplear agentes entomopatógenos en mezcla con enzimas involucradas en la virulencia de dichos microorganismos.

Proteínas derivadas de baculovirus

Como se mencionó, los baculovirus producen gran cantidad de proteínas involucradas en su patogenicidad y virulencia, muchas de las cuales se encuentran expuestas en el cuerpo de inclusión y mejoran la eficiencia del proceso de infección. Dichas proteínas se han empleado durante más de veinte años para mejorar el efecto insecticida de los baculovirus mediante su modificación genética, y se ha logrado disminuir su tiempo o su concentración letal; sin embargo, la seguridad de estos virus recombinantes debe ser investigada más a fondo. Además, se deben tener en cuenta las restricciones legales que existen en varios países para el uso de organismos genéticamente modificados (Ravensberg, 2011). En este contexto resulta más interesante sacar provecho de la adición de estas proteínas a los bioplaguicidas, ya sea que estén producidas por otros organismos o como proteínas derivadas de los cuerpos de inclusión virales.

Un ejemplo de esto es el uso combinado de las proteínas del granulovirus de *Xestia c-nigrum* (XecnGV), cuyo análisis genético demostró que posee cuatro proteínas enhancinas y otras proteasas importantes (Hayakawa et al., 1999) como potenciadores de la actividad del nucleopoliedrovirus de *Mamestra configurata* (MacoNPV). Las enhancinas causan degradación de la mucina, el principal componente de la membrana peritrófica, lo cual permite un mayor acceso de los viriones a las células epiteliales del intestino medio y da como resultado una mayor susceptibilidad del insecto a la infección viral (Biedma, Salvador, Ferrelli, Sciocco-Cap, & Romanowski, 2015). Se emplearon las proteínas alcalinas solubles de XecnGV junto con MacoNPV en ensayos de campo sobre cultivos de repollo durante dos años y se confirmó el efecto potenciador de las proteínas solubles de GV sobre la infección de nucleopoliedrovirus y sobre la potencia de las formulaciones, que contenían

10^5 cuerpos de inclusión/mL de NPV y 5 µg/mL de proteínas de GV para el control de larvas de *Mamestra brassicae* (Goto, Mukawa, & Mitsunaga, 2015). Aun así, es necesario explorar la posibilidad de desarrollar cepas virales recombinantes que contengan las proteínas potenciadoras o sinérgicas dentro de su genoma, mediante métodos que garanticen su estabilidad y seguridad.

Toxinas

Las toxinas provenientes de los arácnidos (principalmente escorpiones) han sido ampliamente estudiadas en este contexto, ya que contienen moléculas que actúan específicamente sobre los insectos, los paraliza o los matan (con dosis altas) y no tienen efectos en los mamíferos (Gurevitz et al., 2007; Ortiz & Possani, 2015; Rohou et al., 2007). Un grupo de toxinas de escorpión denominadas β-NaScTxs se acoplan al sitio 4 de los canales de sodio de las neuronas motoras y provocan su activación prematura, causando espasmos musculares y parálisis (Pelhate & Zlotkin, 1982). También se ha demostrado que esta familia de toxinas, en altas concentraciones, no afecta las neuronas de los mamíferos (De Dianous, Hoarau, & Rochat, 1987). Gracias a la especificidad de dichas toxinas por los canales de sodio de los insectos, estas moléculas han sido propuestas como alternativa para el control de insectos plaga. Sin embargo, la gran limitante en su implementación ha sido la forma de aplicación. Las arañas y los escorpiones inyectan sus toxinas directamente en los insectos y estas se diseminan rápidamente a través de la hemolinfa. No se observa penetración a través de la cutícula de los insectos o mediante la ingestión, lo cual limita su aplicación directa sobre los cultivos (Ortiz & Possani, 2015).

Una solución potencial es utilizar entomopatógenos que faciliten el paso de las toxinas del tracto digestivo a la hemolinfa. En la década de los noventa se realizaron estudios sobre la modificación genética de baculovirus para que expresen toxinas de arañas (Kiyatkin, Kulikovskaya, Grishin, Beadle, & King, 1995; Rohou et al., 2007) o β-toxinas de escorpiones, ya que se estaban comenzando a utilizar como método de control de plagas (Maeda et al., 1991). El baculovirus modificado de *Autographa californica* con la toxina del escorpión *Androctonus australis* incrementó la velocidad de mortalidad de larvas entre un 10 y un 15 % aproximadamente y, además, gracias al efecto paralítico de las toxinas, el área foliar consumida por las larvas se redujo cerca del 25 % (Cory et al., 1994). Similarmente, el nucleopoliedrovirus de *Helicoverpa armigera* modificado con la misma toxina redujo su tiempo letal entre un 17 y un 34 %, y el tiempo en que las larvas se alimentaron, entre el 30 y el 43 % (Sun et al., 2004). De la misma forma, se han desarrollado cepas de *Metarhizium acridum* con dos toxinas de escorpión diferentes y en ambos casos se observó un incremento en la velocidad de crecimiento de micelio en la hemolinfa y una reducción en el tiempo letal de aproximadamente el 30 % en *Locusta migratoria* (Peng & Xia, 2014; 2015). Paralelamente se observó que se necesita un 45 % menos de esporas de *M. anisopliae* modificado con β-NaScTxs para lograr la concentración letal 50 en mosquitos vectores de malaria (Bilgo et al., 2017). Sin embargo, debido a la baja aceptación de los microorganismos modificados genéticamente, se ha detenido el desarrollo de esta tecnología. No obstante, los cambios en la opinión pública y la legislación, en el futuro, podrían revivir su continuidad.

Como alternativa a la modificación genética de los baculovirus, las toxinas también se pueden utilizar como aditivos en las formulaciones. Las toxinas de arañas y escorpiones recombinantes se han ligado a proteínas transportadoras como la lignina GNA (*Galanthus nivalis* agglutinin). Al ligar la neurotoxina de la araña *Segestria florentina* con GNA se observó una mortalidad en el saltahojas del arroz, *Nilaparvata lugens*, del 100 % después de siete días, y un incremento del 50 % en la mortalidad del áfido *Myzus persicae* en comparación con el control (Down et al., 2006). La fusión de GNA con la toxina del escorpión *Mesobuthus tamulus* mostró una alta mortalidad (entre el 70 y el 90 %) en la polilla del tomate *Lacanobia oleracea* (Trung, Fitches, & Gatehouse, 2006). Aunque se ha visto que este método no es específico y puede afectar diferentes órdenes de insectos, se ha observado que en larvas de *L. oleracea* inyectadas con estas proteínas de fusión a una dosis subletal no se ve afectado el desarrollo del parasitoide *Eulophus pennicornis*, lo cual sugiere que puede ser un método complementario en programas de manejo integrado de plagas (Nakasu et al., 2016). Sin embargo, es necesario que se evalúe su efecto sobre enemigos naturales depredadores.

De momento no se han evaluado mezclas de baculovirus con las combinaciones de GNA y toxinas (GNA/Tx) y aún quedan muchos interrogantes por resolver. En primer lugar, hay que determinar qué cantidad de GNA/Tx es suficiente para potencializar el efecto de los baculovirus para que estos se puedan usar de forma correctiva. Esta cantidad va a definir si el producto es viable económicamente o si es más efectivo usar únicamente el GNA/Tx. Otra alternativa es evaluar únicamente las toxinas como aditivo para potenciar los baculovirus. Dado que los baculovirus abren poros en la membrana peritrófica, es posible que los orificios sean suficientes para que las toxinas lleguen a la hemolinfa.

Los metabolitos bioactivos producidos por los diferentes organismos tienen un alto potencial para ser empleados como potenciadores de la actividad insecticida de microorganismos entomopatógenos, enfocados a mejorar diferentes características de los bioplaguicidas que se emplean tradicionalmente en los sistemas productivos. Dada la poca aceptación de emplear organismos genéticamente modificados, una opción viable es la producción de estos metabolitos en sistemas de biofábricas y su inclusión aditiva en las formulaciones, con resultados interesantes demostrados en laboratorio y, en algunos casos, en campo.

Muchos de estos logros se derivan de una mayor comprensión de la biología de estos organismos y de la inversión en este tipo de investigaciones que se orientan al empleo racional y seguro de entomopatógenos como agentes de control de insectos.

Combinación de microorganismos en el control de insectos plaga

La interacción patógeno-hospedero se limita en la mayoría de los casos al estudio de una sola especie de patógeno, sin embargo, se ha venido conociendo que en la naturaleza las infecciones múltiples son mucho más comunes de lo que se suponía. Se pueden dar naturalmente infecciones en las que dos o más agentes infecciosos coexisten en el mismo hospedero y pueden ser de linajes muy diferentes, incluso genéticamente, pero pertenecientes a una misma especie. En el caso de infecciones mixtas, pueden darse interacciones complejas entre los patógenos involucrados, se puede aumentar o suprimir la capacidad virulenta de ambos agentes infectivos o puede elevarse la capacidad de uno y disminuirse la del otro. En último caso, los agentes están compitiendo por un recurso, que es el hospedero, o, más aún, podrían competir por una parte específica del recurso (hemolinfa, cuerpos grasos, tejidos o células determinadas).

Hongos entomopatógenos con otros microorganismos

Dentro de las estrategias de control biológico se puede incluir el uso de agentes biológicos de manera combinada, dentro de las cuales es posible evidenciar eventos de sinergismo o capacidad aditiva en su toxicidad. Tal es el caso de un estudio realizado por Torres & Cotes (1999), en el cual, al evaluar un aislamiento del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* y otro de *Metarhizium anisopliae* contra del gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax*, encontraron un incremento en el porcentaje de eficacia al usarlos de manera combinada con respecto a su aplicación individual. La combinación de los aislamientos se hizo ajustándolos a su concentración letal media (CL_{50}), la cual fue de 55×10^5 conidios mL^{-1} para *B. bassiana*, y para *M. anisopliae* de 13×10^5 conidios mL^{-1}. Se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de eficacia alcanzados para el día 10 por dichos tratamientos, incluyendo los obtenidos por los testigos absoluto y tratado (tratamiento de los insectos con Tween 80 al 0,1 %). Al evaluar la actividad biocontroladora de manera combinada sobre adultos de *P. vorax*, se encontró un porcentaje de eficacia del 25 % al día siguiente de inoculados. Este porcentaje aumentó rápidamente hasta alcanzar una eficacia del 51,84 % y del 100 % para el día cuarto y décimo respectivamente. En contraste, cuando se evaluaron los aislamientos de manera individual, se observó, al siguiente día de haber inoculado los insectos, una

eficacia del 3,7 % y del 14,29 % para *B. bassiana* y *M. anisopliae* respectivamente. Sin embargo, aunque estos porcentajes aumentaron gradualmente, no fue posible alcanzar el 50 % de eficacia al décimo día.

La disminución en el tiempo de la mortalidad de los insectos tratados con la mezcla de los aislamientos con respecto a su utilización individual podría relacionarse con un efecto sinérgico de mecanismos de acción de cada microorganismo. Estos resultados podrían explicarse, en parte, por la acción combinada de las toxinas de *B. bassiana* y de *M. anisopliae* a la que se sometieron los insectos.

En procesos de control biológico con *Metarhizium* spp., normalmente se lleva a cabo una síntesis de diferentes péptidos cíclicos de variada composición amino e hidroxiamino, como es el caso de las destruxinas producidas por *M. anisopliae*, toxinas que, según Poprawski, Robert y Maniana (1985), pueden variar en su acción sobre el hospedero. Tal es el caso de la destruxina E, que puede actuar en el momento de la infección con un efecto tóxico caracterizado por producir en el insecto flacidez y parálisis del cuerpo. Además, el aislamiento de *B. bassiana* podría haber sintetizado los compuestos denominados beauvericina, beauveroliodes y bassionalidae, los cuales están asociados con la actividad insecticida del hongo (Gillespie & Claydon, 1989).

Este evento de sinergismo en la toxicidad se apoya en el hecho de haber obtenido al día siguiente de la inoculación de los adultos con la mezcla una eficacia del 25 %, mientras que, en este mismo día, al utilizarlas de manera individual, se obtuvieron eficacias del 3,57 % y del 14,29 % respectivamente para *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Teniendo en cuenta estos resultados, el más rápido efecto de mortalidad podría atribuirse a la actividad de *M. anisopliae*. Además, la actividad de este hongo podría haber sensibilizado los insectos a otros mecanismos de acción correspondientes a *B. bassiana* o a *M. anisopliae* que involucran procesos mecánicos y enzimáticos (Khachatourians, 1991). Después del contacto entre el hongo entomopatógeno y el insecto, se da una síntesis de enzimas con efecto específico sobre cada uno de los componentes de la epicutícula y la cutícula. La primera es desintegrada por la acción de las lipasas y la segunda por las quitinasas, N-acetil- β-glucosaminidasas y proteasas (Clarkson & Charnley, 1996). Dentro de estas enzimas, la serina proteasa de *M. anisopliae* presenta dos actividades, Pr1 y Pr2, responsables de la hidrólisis del 25 % al 30 % de las proteínas cuticulares que son secretadas por el apresorio y por la hifa, que penetra la cutícula, así como también de la separación física de capas (Khachatourians, 1991). Estas enzimas de *M. anisopliae* podrían haber causado rompimiento de la cutícula del insecto, facilitando así la penetración de *B. bassiana*. Los resultados demostraron que, al utilizarse de forma combinada, puede existir una interacción que potencializa la actividad biocontroladora de los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Esta interacción puede darse desde muchas estrategias: sinergismo, adición, mutualismo o sintrofia. En el caso de mutualismo, los microorganismos superan algún factor limitante en el medio, lo cual facilita su desarrollo, mientras que en el caso de sintrofía los microorganismos podrían compartir el microambiente, pues el metabolismo de uno sería accesible al otro (Campbell, 1987).

Como se mencionó al principio de este apartado, la acción combinada de los microrganismos no siempre repercute en el aumento de la mortalidad. Tal es el caso de un trabajo hecho por Uma Maheswara Rao, Uma Devi y Akbar Ali Khan (2006) en el que sometieron larvas de segundo instar de *Spodoptera litura* a la aplicación conjunta de *Metarhizium rileyi* (antes *Nomuraea rileyi*) y *B. bassiana* en dos niveles de temperatura, una constante (25 °C) y una variable (32 °C/8 horas y 21 °C/16 horas); como resultado, los dos hongos no tuvieron efecto sinérgico sobre la mortalidad de los insectos.

Sin embargo, se han encontrado efectos sinérgicos o aditivos entre patógenos de otros grupos sistemáticos, por ejemplo, se han observado efectos durante la infección fúngica combinada de *Metarhizium* y *Beauveria* y bacterias como *Bacillus thuringiensis* y *Pseudomonas* (Yaroslavtseva et al., 2017). Por ejemplo, Mwamburi, Laing y Miller (2009) encontraron una reducción del 52 % de emergencia de adultos de *Musca domestica* cuando aplicaron a las larvas en el agua 500 mg/kg de la combinación de *B. thuringiensis* var. *israelensis* y un aislamiento de *B. bassiana*. Contra el barrenador asiático del maíz *Ostrinia furnacalis* se ha evaluado en laboratorio la combinación de la toxina Cry1Ac de *B. thuringiensis* y *B. bassiana*,

y se encontraron efectos aditivos sobre larvas de tercer instar (Ma et al., 2008). Lednev et al. (2008) aplicaron una combinación de *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *Pseudomonas* spp. sobre *Locusta migratoria*, y como resultado la mortalidad aumentó y el tiempo letal disminuyó. Para el manejo de la polilla *Sesamia nonagrioides* se han evaluado combinaciones de *B. thuringiensis* con *M. anisopliae* y *B. thuringiensis* con *B. bassiana* y se obtuvieron efectos aditivos y mortalidad entre el 60 al 100 % (Mantzoukas, Milonas, Kontodimas, & Angelopoulos, 2013). De igual manera, con la combinación de un aislamiento de *B. bassiana* y de *B. thuringiensis* sobre larvas de segundo y cuarto instar de *Earias vittella* se encontró un aumento en la mortalidad y una tasa menor de formación de pupas, de adultos y de eclosión de huevos (Ali, Wakil, Zia, & Sahi, 2015). Wraight y Ramos (2005) determinaron la eficacia en parcelas de campo de una mezcla de *B. thuringiensis* y *B. bassiana* sobre poblaciones larvales de *Leptinotarsa decemlineata*, y obtuvieron una reducción en la población de hasta un 35 %. Por último, Yaroslavtseva et al. (2017) realizaron ensayos biológicos combinando *Metarhizium robertsii* (7×10^5 conidios mL^{-1}) con un aislamiento de *B. thuringiensis* ssp. *morrisoni* var. *thuringiensis* (2×10^6 cristales y esporas mL^{-1}) sobre larvas de cuarto instar de *L. decemlineata*. Encontraron una reducción en el tiempo letal (tres días) en comparación con el hongo (ocho días) y la bacteria, la cual fue igual al testigo. Se concluyó que hubo un efecto sinérgico en comparación con la aplicación individual de cada microorganismo.

Los mismos autores le atribuyeron a la bacteria un cambio de la reacción inmunofisiológica del insecto que permite el incremento de la susceptibilidad a la infección fúngica. La bacteria mejora la actividad fenoloxidasa, inhibiendo la inmunidad celular e interrumpiendo la respuesta del sistema detoxificativo a la acción del hongo.

En cuanto a la combinación con virus entomopatógenos, hay muy pocos estudios desarrollados. Lecuona y Alves (1988) encontraron efectos en laboratorio al mezclar *B. bassiana*, *Beauveria brongniartii* con el virus de la granulosis de *Diatraea saccharalis* (DsGV). Los autores registraron una mejoría en la eficacia de los hongos, pero sin que se modificara la del virus. Por otro lado, Pauli (2009) mezcló en laboratorio un aislamiento de *M. anisopliae*, uno de *B. bassiana* y DsGV y encontró un efecto aditivo en la mezcla con *M. anisopliae*, CL_{50} fue de 1,97 x 10^7 CI mL^{-1}, aunque se puede considerar una concentración letal algo alta. Con *B. bassiana*, se encontró un efecto antagonista.

Coinfecciones virales: virus - virus

El uso de virus entomopatógenos se ha enfocado principalmente en el desarrollo de estrategias de control biológico mediante el uso individual de aislamientos virales para el control de insectos de importancia agrícola o de importancia en salud humana; sin embargo, en diferentes estudios se han evidenciado interacciones virus-virus que pueden determinar cambios en el desarrollo de la infección. Aunque la mayoría de estas interacciones han sido descubiertas por casualidad y son el resultado de procesos evolutivos por la característica propia de los virus como parásitos obligados, existen algunos casos en donde las combinaciones dirigidas entre virus entomopatógenos han mostrado tener un efecto significativo en la patogénesis viral (Cuartas & Villamizar, 2011). Este cambio en la patogénesis puede darse por interacciones directas de genes virales o producto de los genes, interacciones indirectas que modifican las condiciones del hospedero o interacciones que perturban el sistema inmune de los insectos (DaPalma, Doonan, Trager, & Kasman, 2010).

Las diferencias medibles en las combinaciones virales incluyen cambios en el tropismo celular, en los procesos de replicación viral, producción y liberación de progenie, latencia y patología de la infección por cambios a nivel del sistema inmune (Waner, 1994), lo que conlleva a un aumento de la tasa de replicación y de la patología viral en comparación con infecciones individuales (Kasman, 2010). Aunque en la actualidad existen más de quince familias virales que afectan insectos (International Committee on Taxonomy of Viruses [ICTV], 2016), solo en las familias Ascoviridae, Baculoviridae, Metaviridae, Polydnaviridae, Poxviridae y Reoviridae se han evidenciado este tipo de interacciones (Cuartas & Villamizar, 2011). A continuación, se exponen algunos ejemplos.

Interacciones directas

Las interacciones directas se caracterizan porque ocurre una interacción física directa entre el producto de los genes de dos virus distintos (DaPalma et al., 2010), lo cual da como resultado virus ayuda-dependientes (*helper-dependent viruses*), cuya replicación o proceso de infección es defectivo por sí solo y requiere del producto de los genes de otros virus para producir una progenie infecciosa, recombinaciones genómicas que se producen naturalmente en la evolución viral como un mecanismo genético, que contribuye a la heterogeneidad del genoma y a su plasticidad, y virus incrustados (*embedded viruses*), como es el caso de los retrovirus, que se integran en el genoma de un virus ADN grande no relacionado (Cuartas & Villamizar, 2011; DaPalma et al., 2010; Jehle, Fritsch, Huber, & Backhaus, 2003). Este tipo de interacción requiere que la coinfección viral se desarrolle en una misma célula, pero no necesariamente que la infección ocurra al mismo tiempo (DaPalma et al., 2010).

Para el caso de los virus ayuda-dependientes, un ejemplo de este proceso se presenta cuando un aislamiento viral que no tiene la capacidad de replicarse en cierta línea celular se combina con un aislamiento que sí se puede replicar, dando como resultado una disminución en la producción de partículas virales del segundo virus y una alta producción de partículas virales del primero, posiblemente por la activación de factores de transcripción y traducción y por la elución de los mecanismos de defensa del hospedero (López-Ferber, Simón, Williams, & Caballero, 2003). Este efecto se ha evidenciado en la combinación entre el MNPV de *Lymantria dispar* (LdMNPV) y el MNPV de *Autographa californica* (AcMNPV) en la línea celular Ld652Y (Guzo, Rathburn, Guthrie, & Dougherty, 1992; McClintock & Dougherty, 1987), entre AcMNPV y el MNPV de *Spodoptera exigua* (SeMNPV) en las líneas celulares Sf21 de *Spodoptera frugiperda* y High 5 de *Trichoplusia ni* (Cheng & Lynn, 2009; Yanase, Yasunaga, Hara, & Kawarabata, 1998) y en la coinfección entre AcMNPV y el MNPV de *Thysanoplusia orichalcea* (ThorMNPV) en la línea celular Sf21 (Wang, Salem, Lynn, & Cheng, 2008). Otro ejemplo se presenta en la coinfección entre genotipos defectivos y genotipos completos como el MNPV de *Choristoneura fumiferana* y de *S. frugiperda*, cuyos genotipos defectivos no infectan por vía oral al carecer de los genes *pif* (gen de infectividad *per os*). La coinfección entre estos genotipos permite que los genotipos defectivos atraviesen el intestino medio y entren al hemocele de la larva para replicarse en otros tejidos (Lauzon, Jamieson, Krell, & Arif, 2005).

En cuanto a las recombinaciones genómicas, un ejemplo de esta interacción se presenta entre el NPV de *Bombyx mori* (BmNPV) y el AcMNPV, donde se ha evidenciado aproximadamente un 90 % de homología entre el material genético; sin embargo, el AcMNPV se replica muy bien en líneas celulares de *T. ni* y de *S. frugiperda* en las cuales el BmNPV no es capaz de replicarse y, por el contrario, en la línea celular desarrollada para *B. mori* se puede replicar, pero debido a la ausencia de transcripción de genes tardíos de proteínas estructurales no tiene la capacidad de producir viriones brotados (Rahman & Gopinathan, 2003). En la línea celular de *B. mori*, la coinfección entre BmNPV y AcMNPV conlleva a la producción de virus recombinantes que presentan alta variación entre los patrones de los parentales, debidos a procesos de recombinación genética y a que tienen la capacidad de crecer en esta línea celular donde antes no lo podían hacer (Kondo & Maeda, 1991; Rahman & Gopinathan, 2003).

En el caso de los virus incrustados, este tipo de interacción solo ocurre con los retrovirus que tras un proceso de coinfección se integran al genoma de un virus ADN grande no relacionado, como en el caso de los baculovirus. Este efecto se ha evidenciado entre el retrovirus *T. ni* y AcMNPV, donde el retrovirus se integra al genoma del NPV durante la replicación viral y adquiere una vía diferente para su entrada y transmisión dentro del hospedero, debido a la alteración de los genes de AcMNPV por la expresión de los genes del retrovirus (Friesen & Nissen, 1990).

Interacciones indirectas

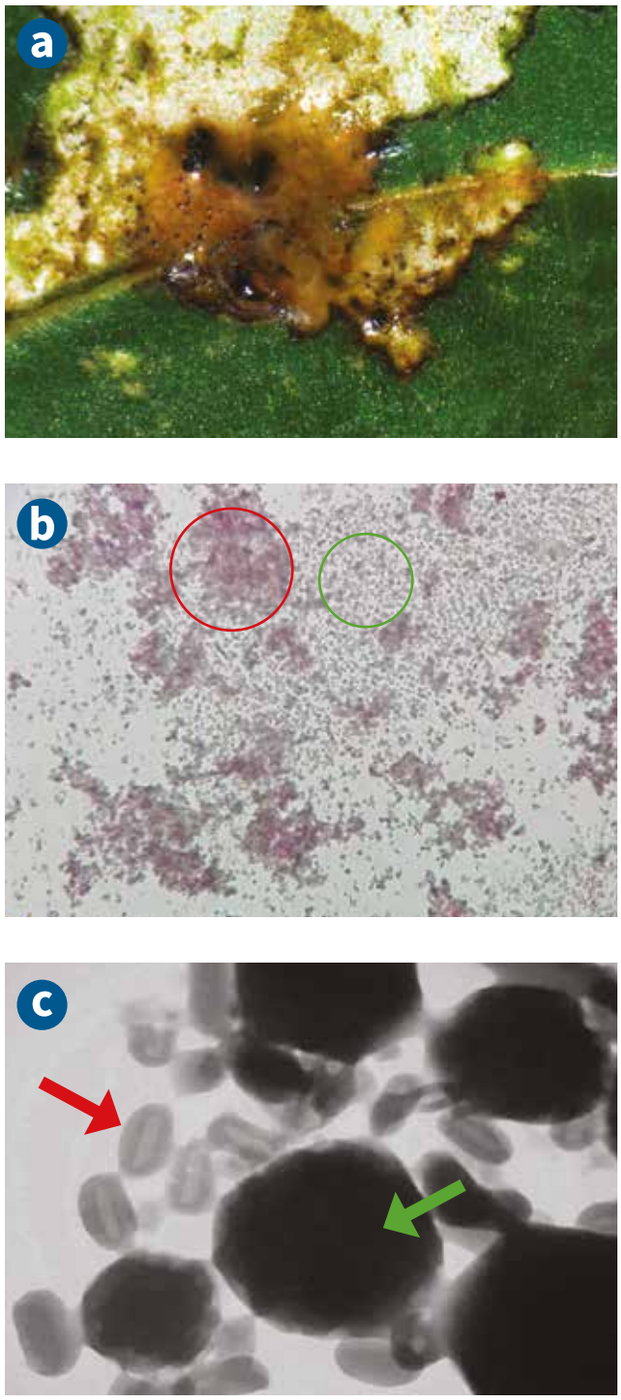
Las interacciones indirectas se presentan cuando ocurre una alteración del medio ambiente del hospedero debido a una coinfección previa o simultanea de dos virus diferentes que originan cambios en la susceptibilidad del hospedero por alteración de las barreras físicas de protección o cambios en la actividad

biológica por factores de potenciación que inducen cambios citopáticos, disminuyendo los valores de las concentraciones letales y de los tiempos de mortalidad (DaPalma et al., 2010).

Para este caso, en muchos aislamientos de baculovirus (la mayoría, granulovirus) se han encontrado genes auxiliares que codifican para proteínas como enhancinas y quitinasas que pueden alterar la estructura de la principal barrera de defensa de los insectos que corresponde a la membrana peritrófica (MP) y ejercen una actividad potenciadora cuando son mezclados con nucleopoliedrovirus. Estas proteínas actúan digiriendo las proteínas de la MP de los insectos infectados, alterando así la integridad estructural e incrementando su permeabilidad, lo que permite un ingreso más rápido de las partículas virales a las células y favorece el proceso de infección (Granados, Fu, Corsaro, & Hughes, 2001; Hoover, Humphries, Gendron, & Slavicek, 2010; Rao et al., 2004; Shapiro, Preisler, & Robertson, 1987; Slavicek, 2012).

En este sentido, se han descrito diferentes combinaciones virales entre GV y NPV que mejoran la patogenicidad viral (figura 21.3). Por ejemplo, la mezcla entre un GV y un NPV de *Spodoptera litura* presenta una potencia relativa de 6,5 con respecto a la patogenicidad del NPV solo (Guo, Fang, Wang, Zhong, & Liu, 2007); la coinfección de un GV y un NPV de *S. exigua* y de un GV de *Xestia c-nigrum* y un NPV de *Mamestra brassicae* presenta una potencia relativa de 10 con respecto a la CL_{50} de los NPV solos (Hayakawa et al., 2000; Mukawa & Goto, 2010); la coinfección entre un GV de *S. frugiperda* y un NPV de *L. dispar* hace que la mezcla sea 13 veces más patogénica que el NPV de manera individual (Shapiro, 2000) y la coinfección entre baculovirus colombianos de *S. frugiperda* (VG008+NPV003) presentó un aumento en la patogenicidad de 9,9 veces, con una CL_{50} de 1,7 x 10^4 CI/ml, en comparación con 1,7 x 10^5 CI/ml cuando se usó el NPV de manera individual (Cuartas, 2014).

En cuanto a la virulencia, el menor tiempo medio de mortalidad (TMM) se ha encontrado con la mezcla entre un GV (VG008) y un NPV (NPV003) colombiano de *S. frugiperda* con una reducción de entre 72 y 96 horas con respecto al NPV individual (Cuartas, 2014). Además, en las mezclas entre el GV de *T. ni* y un npv de *A. gemmatalis*, el GV de *X. c-nigrum* y el NPV de



Fotos: Carlos Espinel y Gloria Patricia Barrera

Figura 21.3. Efecto de la combinación de un nucleopoliedrovirus y un granulovirus sobre *Spodoptera frugiperda*. a. Larva desintegrada por la acción combinada de NPV y GV; b. Imagen de microscopía óptica de purificado viral con azul de toluidina a partir de larva muerta con sintomatología de la infección; se observa la presencia de típicas estructuras de poliedros (círculo verde) e imágenes sugestivas de presencia de granulovirus (círculo rojo); c. Imagen de microscopía electrónica de transmisión de purificado viral con tinción negativa (A. fosfotúngstico) donde se observa la estructura típica de granulovirus (flecha roja) y nucleopoliedrovirus (flecha verde).

M. brassicae y la coinfección entre el GV de *H. armigera* y el NPV de *L. dispar*, han presentado reducciones del TMM de 2,48 y 55 horas respectivamente (Corsaro, Gijzen, Wang & Granados, 1993; Hoover et al., 2010; Mukawa & Goto, 2007; Shapiro, 2000).

En relación con las combinaciones virales que inducen cambios citopáticos (bioquímicos, moleculares, morfológicos, etc.) en las células del hospedero, se ha evidenciado que durante la coinfección entre un NPV de *Pseudaletia unipuncta* (PsunMNPV) y un entomopoxvirus de *Pseudaletia separata* (PsEV) ocurre una potenciación en el ingreso del NPV a las células epiteliales del intestino medio por un aumento en la fusión con las microvellosidades de la membrana debido a la presencia de un factor de potenciación (EF) viral de PsEV, posiblemente codificado por el gen *fusolin* (Hukuhara & Wijonarko, 2001). Asimismo, en la coinfección entre el granulovirus de *P. unipuncta* (PsunGV) y el PsEV, debido a la presencia de factores de potenciación de los dos virus, se observó un aumento en la patogenicidad viral (Hukuhara, Wijonarko, Hosokawa, & Iwano, 2003).

Alteración del sistema inmune

En los insectos, el sistema inmune corresponde únicamente a respuestas innatas conformadas por diferentes mecanismos, como barreras físicas (membrana peritrófica y tegumento), inmunidad celular (reconocimiento de células infectadas, encapsulación y apoptosis) e inmunidad humoral (hemolinas, léctinas, ercosanoides y fenoloxidasa), que generan una protección inespecífica contra diferentes patógenos como bacterias, virus, nematodos, hongos, etc., pero que, en algunos casos, son evadidas de forma exitosa y permiten el desarrollo de la infección (Sparks, Bartholomay, & Bonning, 2008).

En este sentido, se ha observado que mediante la coinfección entre un MNPV de *S. litura* (SpltMNPV) y un polydnavirus asociado a la avispa parasitoide *Microplitis bicoloratus* (MbPDV) se interrumpen los procesos apoptoticos de respuesta inmune del hospedero, posiblemente por la presencia de la proteína P49 presente en el NPV que tiene la función de bloquear la cascada de apoptosis al actuar sobre la caspasa efectora 3 (Luo & Pang, 2006).

Otro ejemplo de una infección mixta que puede llevar a la alteración de este mecanismo de protección se da entre un polydnavirus de *Cotesia congregata* y el AcMNPV en larvas de *Manduca sexta*, en donde se observa un aumento en la susceptibilidad del insecto a la infección, que se refleja en un menor tiempo de mortalidad; esto se debe a que el polydnavirus suprime la respuesta inmune del hospedero que evita la encapsulación de las células infectadas (Washburn, Haas-Stapleton, Tan, Beckage, & Volkman, 2000).

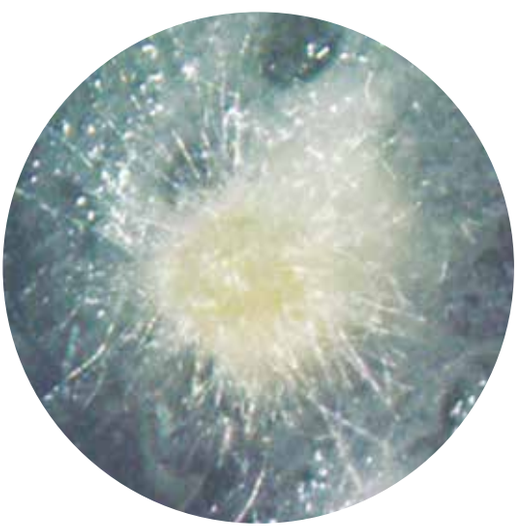
Además, se ha descrito que el AcMNPV puede producir proteínas capaces de bloquear la apoptosis en hospederos permisivos, como las IAP (inhibidores de apoptosis) (Schultz & Friesen, 2009; Zoog, Schiller, Wetter, Chejanovsky, & Friesen, 2002). En este sentido, cuando el AcMNPV infecta células de hospederos no permisivos, como las CF-203 de *Choristoneura fumiferana*, se desencadena la cascada de apoptosis como sistema de defensa; sin embargo, cuando coinfecta simultáneamente este hospedero con el MNPV de *C. fumiferana* (CfMNPV), se disminuyen los niveles de muerte celular hasta en un 99 % y se detecta la síntesis de la proteína P35 y otras proteínas IAP (Palli et al., 1996).

Perspectivas en el uso de coinfecciones virales

Este tipo de estudios acerca de las interacciones entre virus entomopatógenos posibilitan la generación de nuevas estrategias de control de plagas que se pueden combinar dentro de un programa de manejo integrado (Cuartas & Villamizar, 2011). Una primera aproximación se podría generar para ampliar el rango de hospederos mediante virus-ayuda dependientes con la capacidad de potenciar los procesos infectivos a través de sus genes o de sus proteínas transactivadoras, o también mediante la supresión del sistema inmune del hospedero por la interacción con virus capaces de bloquear esta respuesta.

En segundo lugar, para el desarrollo de formulaciones exitosas de agentes microbiales para el control de insectos plaga se podría realizar la potenciación biológica de aislamientos virales por mecanismos de

bloqueo en la respuesta inmune del hospedero o por mecanismos que permitan una entrada y diseminación rápida a las células blanco. Así, para dos grupos de virus entomopatógenos importantes como los baculovirus y los entomopoxvirus se han descrito proteínas como las enhancinas, las quitinasas y las fusolinas que potencian la entrada de las partículas infectivas a las células blanco y la fusión de las partículas virales a las células, lo cual disminuye el tiempo de entrada y de diseminación de los virus dentro del hospedero (Granados et al., 2001; Hukuhara & Wijonarko, 2001). Una tercera estrategia se podría enfocar en mejorar el espectro de hospederos y la actividad biológica viral mediante eventos de recombinación genética (Rahman & Gopinathan, 2003). Aunque se han evidenciado algunas problemáticas en el uso de productos a partir de microorganismos recombinantes por el efecto que podrían tener sobre organismos no blanco y la dispersión del gen modificado fuera del contexto ecológico natural, estas modificaciones podrían incluir cambios en el espectro de los hospederos y en la eficacia biológica, como menores dosis, modificaciones estructurales, deleción e inserción de genes e inserción de hormonas y toxinas (Cuartas & Villamizar, 2011).



Conclusiones y perspectivas

Uno de los mayores retos que tienen que afrontar las diversas disciplinas involucradas en el control biológico de plagas agrícolas en el futuro cercano es el desarrollo de alternativas medioambientalmente amigables al uso extensivo de insecticidas químicos. Aunque el uso tradicional de bioplaguicidas basados en una o varias cepas aún tiene la mayor participación en el mercado, el desarrollo de estrategias de control microbiológico diferentes a las tradicionales se muestra como promisoria, aunque presentan resultados variables y tienen la necesidad de ser validadas en diferentes sistemas insecto-patógeno.

Con el propósito de abordar estos retos, se requeriría abarcar los problemas desde una visión holística, teniendo en cuenta, además del efecto directo del patógeno, la exploración de sus características bioquímicas, los ciclos biológicos, la compatibilidad con sustancias que se adicionen, concentraciones, tipo de entrega o liberación en el ambiente, esto compaginado con el conocimiento de los umbrales de acción del insecto en el cultivo y el sistema ecológico blanco. La clave es buscar nuevos mecanismos que se puedan combinar como una herramienta más del manejo integrado de plagas, un paradigma que se puede ampliar con la adición de estas nuevas estrategias.

Para el caso específico de la tecnología del ARNi, la ventaja desde el punto de vista de la opinión pública es que no tiene que ver con la modificación genética; sin embargo, aún falta bastante investigación. La respuesta variable en diferentes insectos plaga indica que algunos mecanismos de respuesta son aún desconocidos. Estas pruebas no pueden ser hechas con experimentos de ensayo-error: requieren de un entendimiento racional de las moléculas de ARNdc tanto del tejido de las plantas como del insecto que se alimenta de ellas. También se debe continuar con la investigación en sistemas de producción de bajo costo. Pero, sin duda, es una apuesta que durante la próxima década va a ir aumentando exponencialmente e incluyendo muchos más sistemas.

Agradecimientos

Especial agradecimiento al doctor Mariano Belaich de la Universidad de Quilmes por su aporte en la revisión del presente capítulo.

Referencias

Ali, K., Wakil, W., Zia, K., & Sahi, S. T. (2015). Control of *Earias vittella* (Lepidoptera: Noctuidae) by *Beauveria bassiana* along with *Bacillus thuringiensis*. *International Journal of Agriculture & Biology*, *17*(4), 773-778. doi:10.17957/IJAB/14.0009.

Arakane, Y., Specht, C. A., Kramer, K. J., Muthukrishnan, S., & Beeman, R. W. (2008). Chitin synthases are required for survival, fecundity and egg hatch in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *38*(10), 959-962. doi:10.1016/j.ibmb.2008.07.006.

Arora, N., Ahmad, T., Rajagopal, R., & Bhatnagar, R. K. (2003). A constitutively expressed 36kDa exochitinase from *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *307*(6), 620-625. doi:10.1016/S0006-291X(03)01228-2.

Barrios-González, J. (2012). Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochemistry*, *47*(2), 175-185. doi:10.1016/j.procbio.2011.11.016.

Barrios-González, J., & Mejía, A. (1996). Production of secondary metabolites by solid-state fermentation. *Biotechnology Annual Review*, *2*, 85-121. doi:10.1016/S1387-2656(08)70007-3.

Baum, J. A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G. R., Feldmann, P., Ilagan, O., … Pleau, M. (2007). Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology*, *25*(11), 1322-1326. doi:10.1038/nbt1359.

Behle, R. W., & Jackson, M. A. (2014). Effect of fermentation media on the production, efficacy, and storage stability of *Metarhizium brunneum* microsclerotia formulated as a prototype granule. *Journal of Economic Entomology*, *107*(2), 582-590.

Behle, R. W., Jackson, M. A., & Flor-Weiler, L. B. (2013). Efficacy of a granular formulation containing *Metarhizium brunneum* F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) microsclerotia against nymphs of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixoididae). *Journal of Economic Entomology*, *106*(1), 57-63.

Behle, R. W., Richmond, D. S., Jackson, M. A., & Dunlap, C. A. (2015). Evaluation of *Metarhizium brunneum* F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) for control of Japanese beetle larvae in turfgrass. *Journal of Economic Entomology*, *108*(4), 1587-1595.

Biedma, M. E., Salvador, R., Ferrelli, M. L., Sciocco-Cap, A., & Romanowski, V. (2015). Effect of the interaction between *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus and *Epinotia aporema* granulovirus, on *A. gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Biological Control*, *91*, 17-21. doi:10.1016/j.biocontrol.2015.07.006.

Bilgo, E., Lovett, B., Fang, W., Bende, N., King, G. F., Diabate, A., & St. Leger, R. J. (2017). Improved efficacy of an arthropod toxin expressing fungus against insecticide-resistant malaria-vector mosquitoes. *Scientific Reports*, *7*, 3433. doi:10.1038/s41598-017-03399-0.

Bolognesi, R., Ramaseshadri, P., Anderson, J., Bachman, P., Clinton, W., Flannagan, R., … Moar, W. (2012). Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against western corn rootworm (*Diabrotica virgifera* LeConte). *Plos One*, *7*(10), e47534. doi:10.1371/journal.pone.0047534.

Campbell, R. (1987). *Ecología microbiana*. México D. F., México: Limusa.

Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, *136*(4), 642-655. doi:10.1016/j.cell.2009.01.035.

Clarkson, J. M., & Charnley, A. K. (1996). New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology*, *4*(5), 197-203.

Corsaro, B. G., Gijzen, M., Wang, P., & Granados, R. R. (1993). Baculovirus enhancing proteins as determinants of viral pathogenesis. En N. E. Beckage, S. N. Thomson, & B. A. Federici (Eds.), *Parasites and Pathogens of Insects*. (Vol. 2: Pathogens, pp. 127-145). Nueva York, EE. UU.: Academic Press.

Cory, J. S., Hirst, M. L., Williams, T., Hails, R. S., Goulson, D., Green, B. M., … Bishop, D. H. L. (1994). Field trial of a genetically improved baculovirus insecticide. *Nature*, *370*, 138-140. doi:10.1038/370138a0.

Cuartas, P., & Villamizar, L. (2011). Interacciones de los virus entomopatógenos y su efecto sobre la actividad biológica. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, *7*(2), 220-239.

Cuartas, P. E. (2014). *Potenciación de la actividad insecticida de un aislamiento colombiano de nucleopoliedrovirus de Spodoptera frugiperda (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) mediante la coinfección con granulovirus* (tesis de doctorado). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Cheng, X. W., & Lynn, D. E. (2009). Baculovirus interactions *in vitro* and *in vivo*. *Advances in Applied Microbiology*, *68*, 217-239.

DaPalma, T., Doonan, B., Trager, N., & Kasman, L. (2010). A systematic approach to virus-virus interactions. *Virus Research*, *149*(1), 1-9. doi:10.1016/j.virusres.2010.01.002.

De Andrade, E. C., & Hunter, W. B. (2016). RNA interference – natural gene-based technology for highly specific pest control (HiSPeC). En I. Y. Abdurakhmonov (Ed.), *RNA Interference*, InTech. Recuperado de https://www.intechopen.com/books/rna-interference/rna-interference-natural-gene-based-technology-for-highly-specific-pest-control-hispec-. doi:10.5772/61612.

De Dianous, S., Hoarau, F., & Rochat, H. (1987). Re-examination of the specificity of the scorpion *Androctonus australis hector* insect toxin towards arthropods. *Toxicon*, *25*(4), 411-417. doi:10.1016/0041-0101(87)90074-2.

Dos Santos, M. M., Da Rosa, A. S., Dal'Boit, S., Mitchell, D. A., & Krieger, N. (2004). Thermal denaturation: is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes? *Bioresource Technology*, *93*(3), 261-268.

Down, R. E., Fitches, E. C., Wiles, D. P., Corti, P., Bell, H. A., Gatehouse, J. A., & Edwards, J. P. (2006). Insecticidal spider venom toxin fused to snowdrop lectin is toxic to the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) and the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Pest Management Science*, *62*(1), 77-85. doi:10.1002/ps.1119.

Endoh, T., & Ohtsuki, T. (2009). Cellular siRNA delivery using cell-penetrating peptides modified for endosomal escape. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *61*(9), 704-709. doi:10.1016/j.addr.2009.04.005.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, *391*(6669), 806-811. doi:10.1038/35888.

Fire, A. Z. (2007). Gene silencing by double-stranded RNA (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, *46*(37), 6966-6984. doi:10.1002/anie.200701979.

Friesen, P. D., & Nissen, M. S. (1990). Gene organization and transcription of TED, a lepidopteran retrotransposon integrated within the baculovirus genome. *Molecular and Cellular Biology*, *10*(6), 3067-3077.

Garbutt, J. S., Bellés, X., Richards, E. H., & Reynolds, S. E. (2013). Persistence of double-stranded RNA in insect hemolymph as a potential determiner of RNA interference success: evidence from *Manduca sexta* and *Blattella germanica*. *Journal of Insect Physiology*, *59*(2), 171-178. doi:10.1016/j.jinsphys.2012.05.013.

Gillespie, A. T., & Claydon, N. (1989). The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pest Management Science*, *27*(2), 203-215.

Goble, T. A., Gardescu, S., Fisher, J. J., Jackson, M. A., & Hajek, A. E. (2016). Conidial production, persistence and pathogenicity of hydromulch formulations of *Metarhizium brunneum* F52 microsclerotia under forest conditions. *Biological Control*, *95*, 83-93. doi:10.1016/j.biocontrol.2016.01.003.

Gordon, K. H., & Waterhouse, P. M. (2007). RNAi for insect-proof plants. *Nature Biotechnology*, *25*(11), 1231-1232.

Goto, C., Mukawa, S., & Mitsunaga, T. (2015). Two Year Field Study to Evaluate the Efficacy of *Mamestra brassicae* Nucleopolyhedrovirus Combined with Proteins Derived from *Xestia c-nigrum* Granulovirus. *Viruses*, *7*(3), 1062-1078. doi:10.3390/v7031062.

Granados, R. R., Fu, Y., Corsaro, B., & Hughes, P. R. (2001). Enhancement of *Bacillus thuringiensis* toxicity to lepidopterous species with the enhancin from *Trichoplusia* in granulovirus. *Biological Control*, *20*(2), 153-159. doi:10.1006/bcon.2000.0891.

Guo, H., Fang, J., Wang, J., Zhong, W., & Liu, B. (2007). Interaction of *Xestia c-nigrum* granulovirus with peritrophic matrix and *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus in *Spodoptera litura*. *Journal of Economic Entomology*, *100*(1), 20-25. doi:10.1603/0022-0493(2007)100.

Gurevitz, M., Karbat, I., Cohen, L., Ilan, N., Kahn, R., Turkov, M., … Gordon, D. (2007). The insecticidal potential of scorpion β-toxins. *Toxicon*, *49*(4), 473-489. doi:10.1016/j.toxicon.2006.11.015.

Guzo, D., Rathburn, H., Guthrie, K., & Dougherty, E. (1992). Viral and host cellular transcription in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-infected gypsy moth cell lines. *Journal of Virology*, *66*(5), 2966-2972.

Hajos, J., Vermunt, A., Zuidema, D., Kulcsar, P., Varjas, L., De Kort, C., … Vlak, J. (1999). Dissecting insect development: baculovirus-mediated gene silencing in insects. *Insect Molecular Biology*, *8*(4), 539-544. doi:10.1046/j.1365-2583.1999.00150.x.

Hakim, R. S., Baldwin, K., & Smagghe, G. (2010). Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annual Review of Entomology*, *55*, 593-608. doi:10.1146/annurev-ento-112408-085450.

Harrison, R. L., & Bonning, B. C. (2001). Use of proteases to improve the insecticidal activity of baculoviruses. *Biological Control*, *20*(3), 199-209. doi:10.1006/bcon.2000.0899.

Hayakawa, T., Ko, R., Okano, K., Seong, S.-I., Goto, C., & Maeda, S. (1999). Sequence analysis of the *Xestia c-nigrum* granulovirus genome. *Virology*, *262*(2), 277-297. doi:10.1006/viro.1999.9894.

Hayakawa, T., Shimojo, E., Mori, M., Kaido, M., Furusawa, I., Miyata, S., & Granados, R. (2000). Enhancement of baculovirus infection in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae with *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus or *Nicotiana tabacum* engineered with a granulovirus enhancin gene. *Applied Entomology and Zoology*, *35*(1), 163-170.

Herrera-Estrella, A., & Chet, I. (1999). Chitinases in biological control. *EXS*, *87*, 171-184. doi:10.1016/S0144-8617(00)00168-5.

Hoover, K., Humphries, M. A., Gendron, A. R., & Slavicek, J. M. (2010). Impact of viral enhancin genes on potency of *Lymantria dispar* multiple nucleopolyhedrovirus in L. dispar following disruption of the peritrophic matrix. *Journal of Invertebrate Pathology*, *104*(2), 150-152. doi:10.1016/j.jip.2010.02.008.

Hossain, M., Shimizu, S., Matsuki, M., Imamura, M., Sakurai, S., & Iwami, M. (2008). Expression of 20-hydroxyecdysone-induced genes in the silkworm brain and their functional analysis in post-embryonic development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *38*(11), 1001-1007.

Hubbard, M., Hynes, R. K., Erlandson, M., & Bailey, K. L. (2014). The biochemistry behind biopesticide efficacy. *Sustainable Chemical Processes*, *2*, 18. doi:10.1186/s40508-014-0018-x.

Hukuhara, T., & Wijonarko, A. (2001). Enhanced fusion of a nucleopolyhedrovirus with cultured cells by a virus enhancing factor from an entomopoxvirus. *Journal of Invertebrate Pathology*, *77*(1), 62-67. doi:10.1006/jipa.2000.4991.

Hukuhara, T., Wijonarko, A., Hosokawa, Y., & Iwano, H. (2003). Enhanced infection of an entomopoxvirus in larvae of the armyworm, *Pseudaletia separata* (Lepidoptera: Noctuidae), by a granulovirus. *Applied Entomology and Zoology*, *38*(2), 255-259.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). (2016). *Virus taxonomy: 2016 Release*. Recuperado de https://talk.ictvonline.org/taxonomy.

Ivashuta, S., Zhang, Y., Wiggins, B. E., Ramaseshadri, P., Segers, G. C., Johnson, S., … Bolognesi, R. (2015). Environmental RNAi in herbivorous insects. *RNA*, *21*(5), 840-850. doi:10.1261/rna.048116.114.2.

Jackson, M. A., & Jaronski, S. T. (2009). Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. *Mycological Research*, *113*(Pt 8), 842-850.

Jackson, M. A., & Jaronski, S. T. (2012). Development of pilot-scale fermentation and stabilization processes for the production of microsclerotia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* strain F52. *Biocontrol Science and Technology*, *22*(8), 915-930.

Jaronski, S. T., & Jackson, M. A. (2008). Efficacy of *Metarhizium anisopliae* microsclerotial granules. *Biocontrol Science and Technology*, *18*(8), 849-863.

Jehle, J., Fritsch, E., Huber, J., & Backhaus, H. (2003). Intra-specific and inter-specific recombination of tortricid-specific granuloviruses during co-infection in insect larvae. *Archives of Virology*, *148*(7), 1317-1333. doi:10.1007/s00705-003-0104-y.

Kasman, L. M. (2010). *Virus/virus interactions*. Recuperado de http://virusvirus.net/vvi.php.

Khachatourians, G. (1991). Physiology and genetics of entomopathogenic fungi. En D. Arora, I. Ajello, & K. Mukerji (Eds.), *Handbook of Applied Mycology*. (Vol. 2: Humans, Animals and Insects, pp. 613-663). Nueva York, EE. UU.: M. Dekker.

Khachatourians, G. (1996). Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. En D. Howard, & J. Miller (Eds.), *Human and animal relationships* (The Mycota, Vol. VI, pp. 331-363). Berlín, Alemania: Springer.

Kiyatkin, N. I., Kulikovskaya, I. M., Grishin, E. V., Beadle, D. J., & King, L. A. (1995). Functional characterization of black widow spider neurotoxins synthesised in insect cells. *European Journal of Biochemistry*, *230*(3), 854-859.

Kobori, N. N., Mascarin, G. M., Jackson, M. A., & Schisler, D. A. (2015). Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biology*, *119*(4), 179-190.

Kondo, A., & Maeda, S. (1991). Host range expansion by recombination of the baculoviruses *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology*, *65*(7), 3625-3632.

Kontogiannatos, D., Swevers, L., Maenaka, K., Park, E. Y., Iatrou, K., & Kourti, A. (2013). Functional characterization of a juvenile hormone esterase related gene in the moth *Sesamia nonagrioides* through RNA interference. *Plos One*, *8*(9), e73834. doi:10.1371/journal.pone.0073834.

Kourti, A., Swevers, L., & Kontogiannatos, D. (2017). In search of new methodologies for efficient insect pest control: "The RNAi 'Movement'". En V. Shields (Ed.), *Biological control of pest and vector insects*, InTech. Recuperado de https://www.intechopen.com/books/biological-control-of-pest-and-vector-insects/in-search-of-new-methodologies-for-efficient-insect-pest-control-the-rnai-movement-. doi:10.5772/66633.

Kramer, K. J., & Muthukrishnan, S. (1997). Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *27*(11), 887-900.

Kupferschmidt, K. (2013). A lethal dose of RNA. *Science*, *341*(6147), 732-733.

Lauzon, H. A., Jamieson, P. B., Krell, P. J., & Arif, B. M. (2005). Gene organization and sequencing of the *Choristoneura fumiferana* defective nucleopolyhedrovirus genome. *Journal of General Virology*, *86*(Pt 4), 945-961.

Lecuona, R., & Alves, S. (1988). Efficiency of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *B. brongniartii* (Sacc.) Petch. and

granulose virus on *Diatraea saccharalis* (F., 1794) at different temperatures. *Journal of Applied Entomology, 105*(1-5), 223-228.

Lednev, G., Kryukov, V. Y., Khodyrev, V., Levchenko, M., Duisembekov, B., Sagitov, A., & Glupov, V. (2008). Dynamics of mortality of the migratory locust under synchronous infection with entomopathogenic fungi (*Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae*) and bacteria *Pseudomonas* sp. *Contemporary Problems of Ecology, 1*(2), 210-213.

Lingg, A., & Donaldson, M. (1981). Biotic and abiotic factors affecting stability of *Beauveria bassiana* conidia in soil. *Journal of Invertebrate Pathology, 38*(2), 191-200.

Liu, M., Cai, Q., Liu, H., Zhang, B., Yan, J., & Yuan, Z. (2002). Chitinolytic activities in *Bacillus thuringiensis* and their synergistic effects on larvicidal activity. *Journal of Applied Microbiology, 93*(3), 374-379. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01693.x.

López-Ferber, M., Simón, O., Williams, T., & Caballero, P. (2003). Defective or effective? Mutualistic interactions between virus genotypes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 270*(1530), 2249-2255. doi:10.1098/rspb.2003.2498.

Luo, K., & Pang, Y. (2006). *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus inhibits *Microplitis bicoloratus* polydnavirus-induced host granulocytes apoptosis. *Journal of Insect Physiology, 52*(8), 795-806.

Ma, X.-M., Liu, X.-X., Ning, X., Zhang, B., Han, F., Guan, X.-M., ... Zhang, Q.-W. (2008). Effects of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and *Beauveria bassiana* on Asiatic corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Invertebrate Pathology, 99*(2), 123-128.

Maeda, S., Volrath, S. L., Hanzlik, T. N., Harper, S. A., Majima, K., Maddox, D. W., ... Fowler, E. (1991). Insecticidal effects of an insect-specific neurotoxin expressed by a recombinant baculovirus. *Virology, 184*(2), 777-780.

Mamta, B., & Rajam, M. (2017). RNAi technology: a new platform for crop pest control. *Physiology and Molecular Biology of Plants, 23*(3), 487-501. doi:10.1007/s12298-017-0443-x.

Manpreet, S., Sawraj, S., Sachin, D., Pankaj, S., & Banerjee, U. (2005). Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology, 1*(2), 1-9.

Mantzoukas, S., Milonas, P., Kontodimas, D., & Angelopoulos, K. (2013). Interaction between the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki and two entomopathogenic fungi in bio-control of *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre) (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of Microbiology, 63*(3), 1083-1091.

Mao, Y.-B., Cai, W.-J., Wang, J.-W., Hong, G.-J., Tao, X.-Y., Wang, L.-J., ... Chen, X.-Y. (2007). Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology, 25*(11), 1307-1313. doi:10.1038/nbt1352.

Maurel, V. B., Orliaca, O., & Christen, P. (2003). Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. *Process Biochemistry, 38*(6), 881-889.

Mazid, S. (2011). A review on the use of biopesticides in insect pest management. *International Journal of Science and Advanced Technology, 1*(7), 169-178. doi:10.1007/s10886-005-4244-2.

McClintock, J. T., & Dougherty, E. M. (1987). Superinfection of baculovirus-infected gypsy moth cells with the nuclear polyhedrosis viruses of *Autographa californica* and *Lymantria dispar. Virus Research, 7*(4), 351-364.

Miller, S. C., Brown, S. J., & Tomoyasu, Y. (2008). Larval RNAi in *Drosophila? Development Genes and Evolution, 218*(9), 505-510. doi:10.1007/s00427-008-0238-8.

Mukawa, S., & Goto, C. (2007). Enhancement of nucleopolyhedrovirus infectivity against *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) by proteins derived from granulovirus and a fluorescent brightener. *Journal of Economic Entomology, 100*(4), 1075-1083. doi:10.1603/0022-0493(2007)100.

Mukawa, S., & Goto, C. (2010). Mamestra brassicae nucleopolyhedrovirus infection and enhancing effect of proteins derived from *Xestia c-nigrum* granulovirus in larvae of *Mamestra brassicae* and *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on cabbage. *Journal of Economic Entomology, 103*(2), 257-264. doi:10.1603/EC09211.

Mwamburi, L., Laing, M., & Miller, R. (2009). Interaction between *Beauveria bassiana* and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for the control of house fly larvae and adults in poultry houses. *Poultry Science, 88*(11), 2307-2314.

Nakasu, E. Y. T., Karamaouna, F., Partsinevelos, G. K., Abd El Halim, H. M., Fitches, E. C., Pyati, P., ... Edwards, M. G. (2016). Sublethal effects of the insecticidal fusion protein ω-ACTX-Hv1a/GNA on the parasitoid *Eulophus pennicornis* via its host *Lacanobia oleracea*. *Pest Management Science, 72*(3), 585-590. doi:10.1002/ps.4030.

Ortiz-Urquiza, A., Luo, Z., & Keyhani, N. O. (2015). Improving mycoinsecticides for insect biological control. *Applied Microbiology and Biotechnology, 99*(3), 1057-1068. doi:10.1007/s00253-014-6270-x.

Ortiz, E., & Possani, L. D. (2015). The unfulfilled promises of scorpion insectotoxins. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 21*, 16. doi:10.1186/s40409-015-0019-6.

Osman, G. H., Assem, S. K., Alreedy, R. M., El-Ghareeb, D. K., Basry, M. A., Rastogi, A., & Kalaji, H. M. (2015). Development of insect resistant maize plants expressing a chitinase gene from the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis*. *Scientific Reports, 5*, 18067. doi:10.1038/srep18067.

Palli, S., Caputo, G., Sohi, S., Brownwright, A., Ladd, T., Cook, B., ... Retnakaran, A. (1996). CfMNPV

BlocksAcMNPV-Induced Apoptosis in a Continuous Midgut Cell Line. *Virology*, *222*(1), 201-213. doi:10.1006/viro.1996.0411.

Palli, S. R. (2014). RNA interference in Colorado potato beetle: steps toward development of dsRNA as a commercial insecticide. *Current Opinion in Insect Science*, *6*, 1-8.

Pauli, G. (2009). *Interação de Metarhizium anisopliae (Metsch.), Beauveria bassiana (Bals.) e vírus da granulose, principais patógenos de Diatraea saccharalis (Fabr. 1794) (Lepidoptera: Crambidae)* (tesis de maestría). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.

Pelhate, M., & Zlotkin, E. (1982). Actions of insect toxin and other toxins derived from the venom of the scorpion *Androctonus australis* on isolated giant axons of the cockroach (*Periplaneta americana*). *Journal of Experimental Biology*, *97*, 67-77.

Peng, G., & Xia, Y. (2014). Expression of scorpion toxin LqhIT2 increases the virulence of *Metarhizium acridum* towards *Locusta migratoria manilensis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *41*(11), 1659-1666. doi:10.1007/s10295-014-1497-1.

Peng, G., & Xia, Y. (2015). Integration of an insecticidal scorpion toxin (BjαIT) gene into *Metarhizium acridum* enhances fungal virulence towards *Locusta migratoria manilensis*. *Pest Management Science*, *71*(1), 58-64. doi:10.1002/ps.3762.

Perrimon, N., Ni, J., & Perkins, L. (2010). In vivo RNAi: Today and Tomorrow. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(8), a003640. doi:10.1101/cshperspect.a003640.

Poprawski, T. J., Robert, P. H., & Maniana, N. K. (1985). Susceptibility of the onion maggot *Delia antiqua* (Diptera: Antomyiidae) to the mycotoxin Destruxin E. *The Canadian Entomologist*, *117*, 801-802.

Prabhakar, A., Krishnaiah, K., Janaun, J., & Bono, A. (2005). An overview of engineering aspects of solid state fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*, *1*(2), 10-16.

Rahman, M. M., & Gopinathan, K. P. (2003). Analysis of host specificity of two closely related baculoviruses in permissive and nonpermissive cell lines. *Virus Research*, *93*(1), 13-23.

Rao, R., Fiandra, L., Giordana, B., de Eguileor, M., Congiu, T., Burlini, N., ... Pennacchio, F. (2004). AcMNPV ChiA protein disrupts the peritrophic membrane and alters midgut physiology of *Bombyx mori* larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *34*(11), 1205-1213. doi:10.1016/j.ibmb.2004.08.002.

Ravensberg, W. J. (2011). *A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control of arthropods*. Dordrecht, Países Bajos: Springer.

Regev, A., Keller, M., Strizhov, N., Sneh, B., Prudovsky, E., Chet, I., ... Schell, J. (1996). Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, *62*(10), 3581-3586.

Rohou, A., Nield, J., & Ushkaryov, Y. A. (2007). Insecticidal toxins from black widow spider venom. *Toxicon*, *49*(4), 531-549. doi:10.1016/j.toxicon.2006.11.021.

Rothstein, S. J., DiMaio, J., Strand, M., & Rice, D. (1987). Stable and heritable inhibition of the expression of nopaline synthase in tobacco expressing antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *84*(23), 8439-8443. doi:10.1073/pnas.84.23.8439.

Scott, J. G., Michel, K., Bartholomay, L. C., Siegfried, B. D., Hunter, W. B., Smagghe, G., ... Douglas, A. E. (2013). Towards the elements of successful insect RNAi. *Journal of Insect Physiology*, *59*(12), 1212-1221.

Schultz, K. L., & Friesen, P. D. (2009). Baculovirus DNA replication-specific expression factors trigger apoptosis and shutoff of host protein synthesis during infection. *Journal of Virology*, *83*(21), 11123-11132.

Shapiro, M. (2000). Effect of two granulosis viruses on the activity of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Economic Entomology*, *93*(6), 1633-1637. doi:10.1603/0022-0493-93.6.1633.

Shapiro, M., Preisler, H. K., & Robertson, J. L. (1987). Enhancement of baculovirus activity on gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) by chitinase. *Journal of Economic Entomology*, *80*(6), 1113-1116.

Shukla, J. N., Kalsi, M., Sethi, A., Narva, K. E., Fishilevich, E., Singh, S., ... Palli, S. R. (2016). Reduced stability and intracellular transport of dsRNA contribute to poor RNAi response in lepidopteran insects. *RNA Biology*, *13*(7), 656-669. doi:10.1080/15476286.2016.1191728.

Singh, G., Bhalla, A., Bhatti, J. S., Chandel, S., Rajput, A., Abdullah, A., ... Kaur, P. (2014). Potential of chitinases as a biopesticide against agriculturally harmful fungi and insects. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *3*(1), 27-32.

Slavicek, J. M. (2012). *Baculovirus enhancins* and their role in viral pathogenicity. En M. Adoga (Ed.), *Molecular virology* (pp. 147-168), InTech. doi:10.5772/33285. Recuperado de https://www.intechopen.com/books/molecular-virology/baculovirus-enhancins-and-their-role-in-viral-pathogenicity.

Smith, M. E., Henkel, T. W., & Rollins, J. A. (2015). How many fungi make sclerotia? *Fungal Ecology*, *13*, 211-220.

Song, Z., Lin, Y., Du, F., Yin, Y., & Wang, Z. (2017). Statistical optimisation of process variables and large-scale production of *Metarhizium rileyi* (Ascomycetes: Hypocreales) microsclerotia in submerged fermentation. *Mycology*, *8*(1), 39-47.

Song, Z., Shen, L., Zhong, Q., Yin, Y. & Wang, Z. (2016). Liquid culture production of microsclerotia

of *Purpureocillium lilacinum* for use as bionematicide. *Nematology*, *18*(6), 719-726.

Song, Z., Yin, Y., Jiang, S., Liu, J., Chen, H., & Wang, Z. (2013). Comparative transcriptome analysis of microsclerotia development in *Nomuraea rileyi*. *BMC Genomics*, *14*, 411. doi:10.1186/1471-2164-14-411.

Sparks, W. O., Bartholomay, L., & Bonning, B. (2008). Insect immunity to viruses. En N.E. Beckage (Ed.), *Insect Immunology* (pp. 209-242). San Diego, EE. UU.: Academic Press.

Sun, X., Wang, H., Sun, X., Chen, X., Peng, C., Pan, D., … Hu, Z. (2004). Biological activity and field efficacy of a genetically modified *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus expressing an insect-selective toxin from a chimeric promoter. *Biological Control*, *29*(1), 124-137. doi:10.1016/S1049-9644(03)00117-8.

Tenllado, F., Martínez-García, B., Vargas, M., & Díaz-Ruíz, J. R. (2003). Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. *BMC Biotechnology*, *3*, 3. doi:10.1186/1472-6750-3-3.

Thakur, N., Mundey, J. K., & Upadhyay, S. K. (2016). RNAi - Implications in entomological research and pest control. En I. Y. Abdurakhmonov (Ed.), *RNA Interference*, InTech. Recuperado de https://www.intechopen.com/books/rna-interference/rnai-implications-in-entomological-research-and-pest-control. doi:10.5772/61814.

Thamthiankul, S., Moar, W., Miller, M., & Panbangred, W. (2004). Improving the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. aizawai against *Spodoptera exigua* by chromosomal expression of a chitinase gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *65*(2), 183-192. doi:10.1007/s00253-004-1606-6.

Timmons, L., Court, D. L., & Fire, A. (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, *263*(1-2), 103-112. doi:10.1016/S0378-1119(00)00579-5.

Torres, L., & Cotes, A. (1999). Evaluación de la actividad biocontroladora de hongos entomopatógenos contra *Premnotrypes vorax* (Coleoptera: Curculionidae) mediante su utilización individual y combinada. *Revista Colombiana de Entomología*, *25*(3-4), 121-129.

Trung, N. P., Fitches, E., & Gatehouse, J. A. (2006). A fusion protein containing a lepidopteran-specific toxin from the South Indian red scorpion (*Mesobuthus tamulus*) and snowdrop lectin shows oral toxicity to target insects. *BMC Biotechnology*, *6*, 18. doi:10.1186/1472-6750-6-18.

Uma Maheswara Rao, C., Uma Devi, K., & Akbar Ali Khan, P. (2006). Effect of combination treatment with entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Nomuraea rileyi* (Hypocreales) on *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidaeae). *Biocontrol Science and Technology*, *16*(3), 221-232.

Waner, J. L. (1994). Mixed viral infections: detection and management. *Clinical Microbiology Reviews*, *7*(2), 143-151. doi:10.1128/CMR.7.2.143.

Wang, K., Peng, Y., Pu, J., Fu, W., Wang, J., & Han, Z. (2016). Variation in RNAi efficacy among insect species is attributable to dsRNA degradation *in vivo*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *77*, 1-9. doi:10.1016/j.ibmb.2016.07.007.

Wang, L., Salem, T. Z., Lynn, D. E., & Cheng, X.-W. (2008). Slow cell infection, inefficient primary infection and inability to replicate in the fat body determine the host range of *Thysanoplusia orichalcea* nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology*, *89*(Pt 6), 1402-1410.

Washburn, J. O., Haas-Stapleton, E. J., Tan, F. F., Beckage, N. E., & Volkman, L. E. (2000). Co-infection of *Manduca sexta* larvae with polydnavirus from *Cotesia congregata* increases susceptibility to fatal infection by *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus. *Journal of Insect Physiology*, *46*(2), 179-190.

Whyard, S., Singh, A. D., & Wong, S. (2009). Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *39*(11), 824-832. doi:10.1016/j.ibmb.2009.09.007.

Willetts, H. (1971). The survival of fungal sclerotia under adverse environmental conditions. *Biological Reviews*, *46*(3), 387-407.

Wraight, S. P., & Ramos, M. E. (2005). Synergistic interaction between *Beauveria bassiana* and *Bacillus thuringiensis* tenebrionis-based biopesticides applied against field populations of Colorado potato beetle larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, *90*(3), 139-150.

Yanase, T., Yasunaga, C., Hara, T., & Kawarabata, T. (1998). Coinfection of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda* Cell Lines with the Nuclear Polyhedrosis Viruses of *Autographa californica* and *Spodoptera exigua*. *Intervirology*, *41*(6), 244-252. doi:10.1159/000024946.

Yaroslavtseva, O. N., Dubovskiy, I. M., Khodyrev, V. P., Duisembekov, B. A., Kryukov, V. Y., & Glupov, V. V. (2017). Immunological mechanisms of synergy between fungus *Metarhizium robertsii* and bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp. morrisoni on Colorado potato beetle larvae. *Journal of Insect Physiology*, *96*, 14-20.

Zhang, X., Zhang, J., & Zhu, K. (2010). Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *Insect Molecular Biology*, *19*(5), 683-693. doi:10.1111/j.1365-2583.2010.01029.x.

Zhiqiang, A. (2005). *Handbook of Industrial Mycology*. Nueva York, EE. UU.: Marcel Dekker.

Zoog, S. J., Schiller, J. J., Wetter, J. A., Chejanovsky, N., & Friesen, P. D. (2002). Baculovirus apoptotic suppressor P49 is a substrate inhibitor of initiator caspases resistant to P35 in vivo. *The EMBO Journal*, *21*(19), 5130-5140.

Capítulo 22

Las ómicas en el control biológico

Chapter 22

Omics in biological control

Gloria Patricia Barrera,[1] Pablo Daniel Ghiringhelli,[2]
Stephen Mosher,[1] Alejandro Caro-Quintero,[1]
Sebastien Massart,[3] Mariano Nicolás Belaich[2]

[1] Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA)

[2] Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Celular y Molecular - Área Virosis de Insectos (LIGBCM-AVI), Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes

[3] Laboratory of Integrated and Urban Phytopathology, Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liège

Contenido

Introducción 954

Contexto histórico 954

Tecnologías biológicas de alto rendimiento en genómica y transcriptómica 955

Tecnologías biológicas de alto rendimiento en proteómica 957

Tecnologías biológicas de alto rendimiento en metabolómica 959

Bioinformática 960

- La bioinformática y las disciplinas ómicas 961
- La bioinformática y la transformación de datos en información 963

Impacto de las tecnologías biológicas de alto rendimiento en el control biológico 968

- Genómica y control biológico 969
- Transcriptómica y control biológico 970
- Proteómica y control biológico 974
- Metabolómica y control biológico 976
- Perspectivas y desafíos conceptuales 978

Agradecimientos 981

Referencias 982

Resumen

En los últimos años los avances tecnológicos han posibilitado explorar la naturaleza como nunca y, en consecuencia, posicionar la biología como una ciencia de la información. Entre estas nuevas aproximaciones metodológicas de las ciencias de la vida se destacan las *disciplinas ómicas*, cuyo objeto de estudio son conjuntos biomoleculares particulares (ADN, ARN, proteínas o metabolitos secundarios) analizados mediante procedimientos de alto rendimiento. En este sentido, la genómica (con sus derivados: pangenómica y metagenómica), la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica —entre otras disciplinas ómicas— conforman líneas de estudio imprescindibles para describir la naturaleza y potenciar la producción de bienes y servicios biotecnológicos. En este capítulo se hace una recopilación de los procedimientos empleados para hacer estudios ómicos y se resalta su utilidad en la investigación y el desarrollo de agentes de control biológico para invertebrados plaga y fitopatógenos. Se reseña, en consecuencia, la importancia del conocimiento genómico, transcriptómico, proteómico y metabolómico para la comprensión de las características moleculares de hongos, bacterias y virus utilizados en el control biológico. Además, se aporta información sobre el funcionamiento de las relaciones multipartitas para la implementación de la agricultura como un sistema productivo sostenible, amigable con el ambiente y resiliente.

Palabras clave

Genómica, metabolómica, proteómica, transcriptómica

Abstract

Recently, the technological advances have made it possible to explore nature as never before, and to position biology as an information science. Among these new methodological approaches are the disciplines known as "omics", which include all areas of life sciences that take particular biomolecular sets as study objects (eg, DNA, RNA, proteins or secondary metabolites), and that use high-throughput procedures for their approach. Thus, genomics (including derivatives known as pangenomics and metagenomics), transcriptomics, proteomics and metabolomics, among other omics, form important study lines to describe nature and from there, to enhance the generation of products and services in biotechnology. In this context, this chapter compiles the procedures used to carry out omic studies, with special emphasis on the research and development of biological control agents for invertebrate pest and phytopathogens. Thus, the importance of genomic, transcriptomic, proteomic and metabolomic knowledge is underlined in order to understand the molecular reasons that make bacteria, fungi and viruses useful in biological control, as well as to gather information about how multipartite relations work, all central aspects to turn agriculture into a productive, sustainable, environmentally friendly and resilient system.

Keywords

Genomics, metabolomics, proteomics, transcriptomics

Introducción

Las ciencias biológicas se han beneficiado de la revolución tecnológica ocurrida en las últimas décadas, gracias a la cual es más sencillo y productivo hoy en día generar evidencias útiles para la comprensión de la naturaleza. Si algo caracteriza y unifica al siglo XXI es que este representa el inicio de una era en la que la información parece ser la base de todo avance y desarrollo para la humanidad. Nadie duda de que tanto el acceso como el usufructo de la información en sus distintos niveles y dimensiones —desde los progresos en las comunicaciones interpersonales e interinstitucionales, hasta la mejora indiscutible de las ciencias informáticas— han adquirido buenos niveles de democratización y han permeado numerosas disciplinas y actividades humanas. En tal sentido, el beneficio de ello para las ciencias y tecnologías de la vida permitirá mejorar los sistemas agrícolas y transformarlos en más sustentables, resilientes y productivos, lo cual será de gran provecho para la seguridad alimentaria mundial.

Contexto histórico

Desde el siglo XIX las ciencias biológicas han incrementado su marco conceptual de manera significativa. El inicio de este sorprendente camino se debe a las ideas y demostraciones realizadas por Charles Darwin y Gregor Mendel (Charlesworth & Charlesworth, 2009; Liu & Li, 2015). Para el siglo XX, se alcanzó el descubrimiento de que la información contenida en la materia viva está almacenada en el ADN y se halla escrita con una sintaxis particular, con ciertos rasgos de universalidad entre especies. Esta información se expresa como ARN y proteínas, moléculas que concentran la mayor diversidad de actividades útiles en la construcción de células, organismos y, en mayor escala, poblaciones, comunidades y ecosistemas.

A partir de la década de los setenta, la ingeniería genética surgió como un nuevo e imprescindible brazo metodológico de la biotecnología, lo cual generó una auténtica revolución socioproductiva (Miller, 2017). De cierta manera, es posible entender la ingeniería genética como la disciplina que asume el control de la información biológica, que desarrolla estrategias y procedimientos para adquirirla, entenderla e intervenirla con el fin de producir bienes y servicios útiles para la humanidad.

En este devenir histórico, como subproducto de lo anterior, cabe mencionar el nacimiento de las disciplinas ómicas, terminología derivada del sufijo *-oma*, que hace referencia a conjuntos de algo en estudio (Hasin et al., 2017; Moshelion & Altman, 2015). Así, hoy en día se habla con naturalidad de *genómica* (información genética de un individuo) (Thao & Tran, 2016), *pangenómica* (información genética de una especie) (Udaondo, Duque, & Ramos, 2017) y *metagenómica* (información genética de distintas especies conviviendo en un mismo sitio) (Crovadore et al., 2017). También se menciona la *transcriptómica* (moléculas de ARN expresadas por un tipo celular de un individuo) (Nawaz et al., 2017) y la *metatranscriptómica* (moléculas de ARN expresadas por la materia viva que habita en un sitio dado) (Newman et al., 2016). Finalmente, es usual describir evidencias derivadas de la *proteómica* (proteínas expresadas por materia viva) (Lande et al., 2017), la *interactómica* (redes de vínculos entre ADN, ARN y proteínas) (Rodríguez-Llorente et al., 2009) y la *metabolómica* (colección de metabolitos que ayuda a comprender funciones celulares) (Najafabadi, Naghavi, Farahmand, & Abbasi, 2017).

En todos los casos, se hace referencia a conjuntos de información cuya comprensión, manejo y control se realiza mediante aproximaciones de ingeniería genética. Dicha información es fundamental para el desarrollo de tecnologías esenciales para la salud humana o para actividades cruciales de nuestra subsistencia, como la agricultura y la ganadería. Hasin et al. (2017) muestran cómo el diseño de los estudios ómicos requiere de una planificación y ejecución cuidadosas, que suele demandar un gran número de comparaciones, análisis estadísticos e inversión de tiempo y dinero para la aplicación de tecnologías particulares.

Para lograr estos avances significativos ha sido necesario, por tanto, el desarrollo de nuevos procedimientos, conocidos como tecnologías biológicas de alto rendimiento (*high-throughput*), las cuales se caracterizan por incluir metodologías que permiten realizar de miles a millones de experimentos en paralelo y en tiempos cortos, para poder dominar conjuntos informativos complejos. La aplicación de estos métodos se evidencia en numerosos casos, por ejemplo, en las respuestas de la soya a condiciones de estrés tanto de origen biótico (infecciones por *Fusarium oxysporum*, *Heterodera glycines* y el virus del mosaico) como abiótico (sequía, anegamiento, frío, salinidad y deficiencia de fósforo) (Tyczewska, Gracz, Kuczyński, & Twardowski, 2016). Todo este avance tecnológico vino acompañado del progreso de la bioinformática, disciplina que colabora en la comprensión y análisis de la información biológica.

Tecnologías biológicas de alto rendimiento en genómica y transcriptómica

Los primeros "proyectos genoma" estuvieron basados en la metodología de secuenciación propuesta por Frederick Sanger en 1975 (hoy reconocida como la primera generación de métodos para estudiar secuencias de ADN) (Sanger, Nicklen, & Coulson, 1977b). Después, se conformó un consorcio internacional, a finales de la década de los ochenta, para conocer el genoma humano (Moraes & Góes, 2016), objetivo que recién se comenzó a alcanzar a comienzos de este siglo (Lander et al., 2001). Paralelo a este enorme desafío, el mismo propósito se replicó para algunos organismos modelo como *Caenorhabditis elegans* (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998), *Drosophila melanogaster* (Adams et al., 2000) o *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis Genome Initiative, 2000), con los cuales se obtuvieron resultados exitosos antes que en nuestra especie.

Cabe destacar que el primer genoma secuenciado fue el de un bacteriófago (Sanger et al., 1977a), mientras que el primer ser vivo del que se conoció su secuencia genómica fue la bacteria *Haemophilus influenzae* RD (Fleischmann et al., 1995); ambos estudios fueron llevados a cabo mediante el método desarrollado por Frederick Sanger. Sin embargo, los costos y dificultades derivados de estas empresas a finales del siglo XX plantearon la necesidad de innovar tecnológicamente. Ante tales desafíos, en la primera década de este siglo surgieron nuevos procedimientos conocidos como "tecnologías de secuenciación de siguiente generación" (*next generation sequencing* o NGS) (Ambardar, Gupta, Trakroo, Lal, & Vakhlu, 2016), las cuales incluyen las siguientes tecnologías de *segunda generación*: 454 (comercializada por Hoffmann-La Roche, actualmente descontinuada), Illumina (comercializada por Illumina, Inc.) Solid y Ion Torrent (ambas comercializadas por Thermo Fisher Scientific).

Las NGS también incluyen las tecnologías de *tercera generación* o SMRT (*single molecule real time sequencing*), de las cuales, PacBio (comercializada por Pacific Biosciences of California, Inc.) y Nanopore (comercializada por Oxford Nanopore Technologies Limited) son sus representantes disponibles en la actualidad. Tanto las de segunda como de tercera generación son consideradas tecnologías biológicas de alto rendimiento, gracias a cuya aplicación es posible secuenciar genomas o transcriptomas parciales o completos en plazos cortos, así como disponer de información metagenómica y metatranscriptómica, todo a costos más accesibles.

Básicamente, el flujo de trabajo para emplear estas tecnologías consiste en aislar el ácido nucleico de la muestra problema: ADN para genómica o ARN para transcriptómica, provenientes, por ejemplo, de un individuo, de un conjunto de individuos de una misma especie o de una muestra ambiental (suelo o agua) que contiene distintas especies. Después, dicho ácido aislado se convierte en un ADN copia (si originalmente era ARN), se fragmenta y se une a segmentos de ADN de doble cadena de secuencia conocida (adaptadores) para generar una biblioteca (*DNA library*). Una vez obtenida la biblioteca, estas "quimeras" son capturadas en soportes sólidos (generalmente perlas esféricas o celdas de flujo) y amplificadas *in vitro* con ADN polimerasas (solo para

el caso de 454, Illumina, Solid y Ion Torrent, mediante cebadores que hibridan en los adaptadores), para luego adquirir la información de secuencia en paralelo para la totalidad de los fragmentos mediante diferentes métodos según la NGS en cuestión. Estos métodos suelen ser pirosecuenciación y detección de luz blanca (454), terminador de síntesis reversible y fluorimetría (Illumina), ligación de sondas y fluorimetría (Solid), detección con semiconductores de protones derivados de síntesis (Ion Torrent), empleo de la guía de onda de "modo cero" (ZMW, *zero-mode waveguide*) y fluorimetría (PacBio); o detección de cambios de voltaje en una membrana con poros por donde pasan biomoléculas (Nanopore) (Ambardar et al., 2016) (figura 22.1).

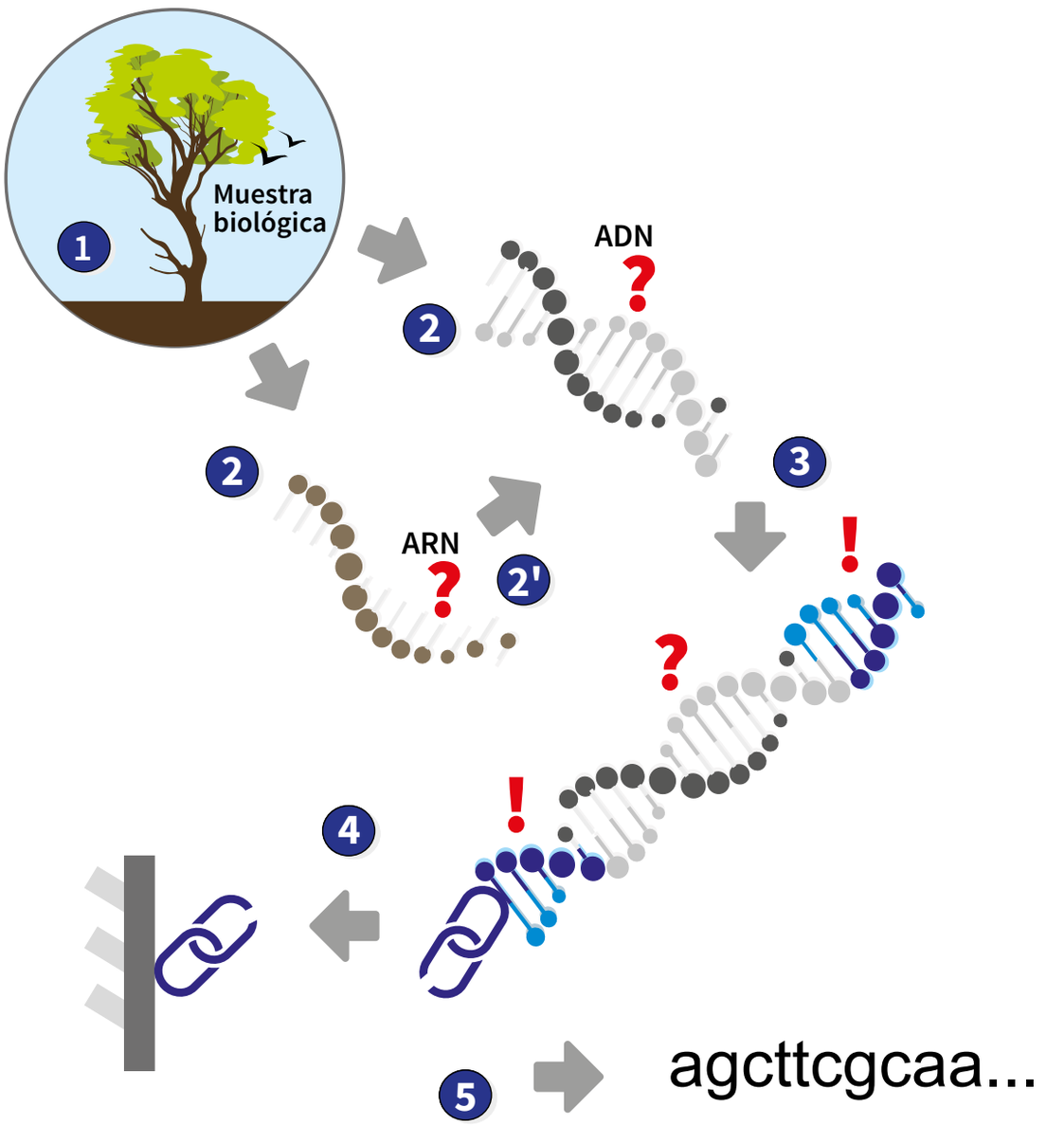


Figura 22.1. Flujo de trabajo para secuenciación de ADN y ARN. 1. Toma de muestra (de individuos, poblaciones y muestras complejas). 2. Aislamiento de ADN o ARN. 2'. El ARN se convierte a ADN copia. 3. Fragmentación y unión de adaptadores de ADN de doble cadena de secuencia conocida para generar una biblioteca (en color azul). 4. Captura en soporte sólido (en algunas tecnologías existe un paso posterior de amplificación *in vitro* con ADN polimerasas). 5. Proceso de secuenciación de cada uno de los fragmentos.

Fuente: Elaboración propia

Las NGS presentan diferentes costos y utilidades según sus capacidades diferenciales, y es común combinarlas para lograr un mayor poder de captura de información o seleccionarlas de acuerdo con el objetivo deseado (Hinrichs et al., 2015; Liu et al., 2012; Wei, Bemmels & Dick, 2014). Por ejemplo, para contemplar una gran cantidad de lecturas o profundidad de la secuenciación es recomendable utilizar Illumina o Solid, mientras que PacBio se destaca en la longitud individual de cada lectura y, por lo tanto, es útil para el ensamblado de las secuencias. Por su parte, Ion Torrent se destaca por mejorar los costos por megabases, pero si se incluye la variable del costo y la portabilidad de los equipamientos, el más económico y pequeño resulta ser el derivado de la tecnología Nanopore. En consecuencia, es necesario proponer el mejor algoritmo de trabajo según el fin particular deseado: conocer la secuencia de un genoma, conocer la diversidad de un pangenoma, disponer de la lista de especies presentes en una muestra o conocer las actividades expresadas en determinadas condiciones ambientales, entre otros.

Otra tecnología biológica de alto rendimiento que se emplea como complemento para la adquisición de secuencias genómicas y transcriptómicas por medio de las NGS es la hibridación en microarreglos (Douglas & Ehlting, 2005; Marzancola, Sedighi, & Li, 2016; Williams, Monge-Monge, Otvos, Reardon, & Ragenovich, 2011). Esta aproximación metodológica se difundió antes de la comercialización de las NGS, por lo cual fue el disparador del desarrollo y aplicación de la inquietud científica en la exploración de la variabilidad pangenómica de las especies y de los patrones de expresión génica derivados.

Estos estudios fueron necesarios para enriquecer y expandir la información genómica producida a partir de los "proyectos genoma" realizados mediante tecnología Sanger, la cual resulta ahora inadecuada por costos y tiempos. Básicamente, la hibridación en microarreglos incluye el aislamiento de una muestra de ácidos nucleicos de interés (del mismo modo que lo indicado para el ADN en estudios genómicos o el ARN en análisis transcriptómicos) y su posterior fraccionamiento y marcación con grupos químicos fluorescentes, para luego enfrentarlos a pequeños chips que contienen miles de oligonucleótidos ordenados y de secuencia conocida (microarreglo) (figura 22.2). Así, en función de los segmentos retenidos (por complementariedad de las bases nitrogenadas), se podrá revelar qué secuencias estaban presentes en la muestra (lo cual indica las variantes genómicas del individuo en estudio o cuáles genes están siendo transcritos).

A pesar de que esta tecnología surgió previamente a los nuevos métodos de secuenciación, aún hoy se sigue utilizando con los mismos fines. Existen numerosas empresas que ofrecen el servicio para el diseño de chips a medida, y su empleo, por ser todavía más económico que el de las NGS, continúa presentándose como una excelente alternativa para enriquecer el conocimiento derivado de las disciplinas ómicas. En particular, la hibridación en microarreglos permite realizar estudios amplios de variabilidad pangenómica —generalmente expresada en SNP (*single nucleotide polymorphisms*) y CNV (*copy number variations*)— que incluyen numerosos individuos, con el posterior análisis de asociación a fenotipos particulares. Esto permite la determinación de biomarcadores útiles, por ejemplo, en el mejoramiento vegetal y animal o en la identificación de secuencias con valor patológico (Chang, Lipka, Domier, & Hartman, 2016; Evans et al., 2008).

Tecnologías biológicas de alto rendimiento en proteómica

Si bien la información de la materia viva está almacenada en moléculas de ADN y es posible revelar los indicios de su expresión a partir de las moléculas de ARN, las actividades centrales están representadas en la fracción proteica. Por ello, a veces resulta imprescindible conocer cuáles actividades biológicas ocurren en un momento dado, para lo cual, es de gran importancia disponer de tecnologías de aproximación proteómica. Cabe destacar que, infortunadamente, no existen procedimientos tecnológicos para la aplicación en polipéptidos tan precisos y con tanta capacidad de recuperación de la información como los ofrecidos por las tecnologías NGS antes mencionadas. Sin embargo, se encuentran opciones que ayudan a su tratamiento,

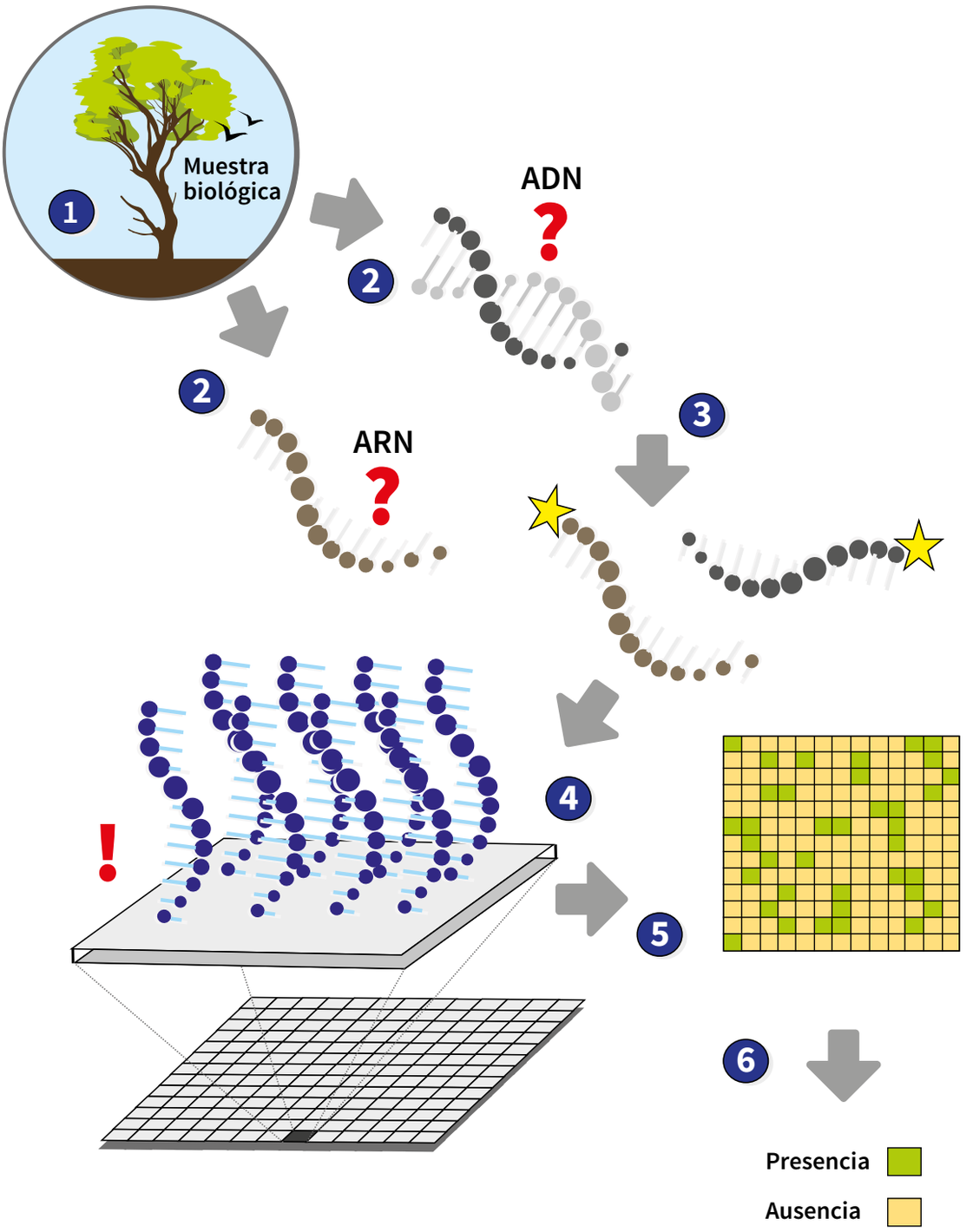


Figura 22.2. Flujo de trabajo para hibridación en microarreglos. 1. Toma de muestra (de individuos). 2. Aislamiento de ADN o ARN. 3. Fragmentación, desnaturalización y marcado con fluorocromos (es posible también amplificar con polimerasas). 4. Mezcla de los ácidos nucleicos de la muestra con el microarreglo en condiciones adecuadas. 5. Revelado. 6. Determinación de secuencias presentes y ausentes en la muestra. También, según como se realice el experimento, es posible extraer información cuantitativa.

Fuente: Elaboración propia

como la espectrometría de masas (Vidova & Spacil, 2017). Esta tecnología permite analizar con gran precisión la distribución de moléculas en función de su masa y carga, de modo tal que, sin secuenciar, se puede aportar evidencia significativa para inferir la presencia de determinadas proteínas y reconocer sus modificaciones postraduccionales. Para ello, la muestra de partida es ionizada mediante diferentes aproximaciones: por *electrospray* (ESI o *electrospray ionization*) o por desorción/ionización con láser asistida por una matriz (Maldi, o *matrix assisted laser desorption/ionization*), entre otras. Después, la muestra se somete a un campo electromagnético y se analizan las masas, también por diferentes aproximaciones: tiempo de vuelo (TOF o *time of flight*) y trampa de iones con cuadrupolo, entre otras. Existen numerosos ejemplos de su aplicación, que incluyen su uso exitoso en la identificación de bacterias patógenas de humanos (Bizzini & Greub, 2010) y de plantas (Kazemi-Pour, Condemine, & Hugouvieux-Cotte-Pattat, 2004), así como de hongos fitopatógenos (Brun et al., 2013).

Debido al gran número de polipéptidos diferentes expresados por una materia viva, suele recomendarse un fraccionamiento de esta, antes de su análisis por espectroscopía de masas. Es frecuente emplear, entonces, electroforesis bidimensional (Najafabadi, Naghavi, Farahmand, & Abbasi, 2017) o técnicas de cromatografía líquida (Qu et al., 2016) para disponer de submuestras menos complejas que faciliten una más completa determinación (figura 22.3). Es importante señalar que, para un mejor aprovechamiento de las aproximaciones proteómicas, es conveniente primero conocer las secuencias genómicas de las materias vivas en estudio y disponer, así, de bases de datos que contengan las masas de las proteínas teóricas que podrían expresar esos organismos, de forma que se les pueda asignar una identidad.

Tecnologías biológicas de alto rendimiento en metabolómica

Todas las funciones que un organismo puede llevar a cabo están escritas en las moléculas de ADN que porta como genoma. Sin embargo, los genes no se expresan todo el tiempo ni se expresan en una proporción similar, por lo cual, si bien conocer esa información es de ayuda, esta no revela cuáles funciones están presentes. Aunque gracias al conocimiento actual que tenemos sobre la diversidad de motivos proteicos es posible hipotetizar —con base en los polipéptidos detectados experimentalmente en una muestra— cuáles serían las funciones activas, es necesario recurrir a otras fuentes de información para tener un conocimiento completo sobre genómica funcional. Es por esta razón que la metabolómica resulta de capital importancia para una mejor comprensión de la fisiología de una célula, de un tejido o de un organismo. Comparativamente, la información pangenómica o metagenómica suele ser poco variable a lo largo del tiempo (aunque para algunos ecosistemas o ciertas especies de vida corta sí pueden suceder variaciones contundentes, producto de la ocurrencia de cambios ambientales, muchos de ellos antropogénicos), mientras que las dimensiones transcriptómicas y proteómicas son consideradas *per se* como de alto dinamismo. Por su parte, la metabolómica podría ser definida como la ventana biológica más dinámica de todas.

Como se mencionó antes, básicamente la metabolómica pretende describir el conjunto de metabolitos (moléculas orgánicas pequeñas, como hormonas, antibióticos, compuestos de señalización o metabolitos secundarios) presentes en una muestra biológica dada, lo cual puede traducirse en un perfil metabólico particular o huella que revela cuestiones fisiopatológicas puntuales del momento en que se tomó la muestra (Gogna, Singh, Sheeba, & Dorai, 2015).

Para su aplicación, primero se deben separar los metabolitos presentes mediante electroforesis capilar o cromatografías en fase gaseosa o líquida, como la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, *high performance liquid chromatography*). Luego se realiza su determinación y potencial cuantificación empleando técnicas que incluyen la espectroscopía de masas y de resonancia magnética nuclear (RMN). Todos estos procedimientos hacen posible, por ejemplo, el estudio

de los metabolitos que producen los microbios o la identificación de los cambios fisiológicos que suceden en insectos sometidos a estreses térmicos (Covington, McLean, & Bachmann, 2016; Chou, Pathmasiri, Deese-Spruill, Sumner, & Buchwalter, 2017). El estudio experimental presenta similitudes con el estudio proteómico (figura 22.3).

Los metabolitos se pueden clasificar, por ejemplo, en primarios y secundarios en virtud de las funciones en las cuales participan (funciones fisiológicas esenciales o auxiliares, respectivamente), y en endógenos y exógenos según el lugar en el que se hayan producido (en el mismo organismo o en otros del entorno, respectivamente). De este modo, su presencia y cantidad relativa puede transformarse en una huella metabólica útil para revelar cuáles funciones biológicas (tanto fisiológicas como patológicas) se encuentran activas.

Bioinformática

La bioinformática es una disciplina científica emergente que se nutre de datos, conocimientos y estrategias provenientes de múltiples disciplinas, entre ellas, la biología, la bioquímica, la biofísica, la biotecnología,

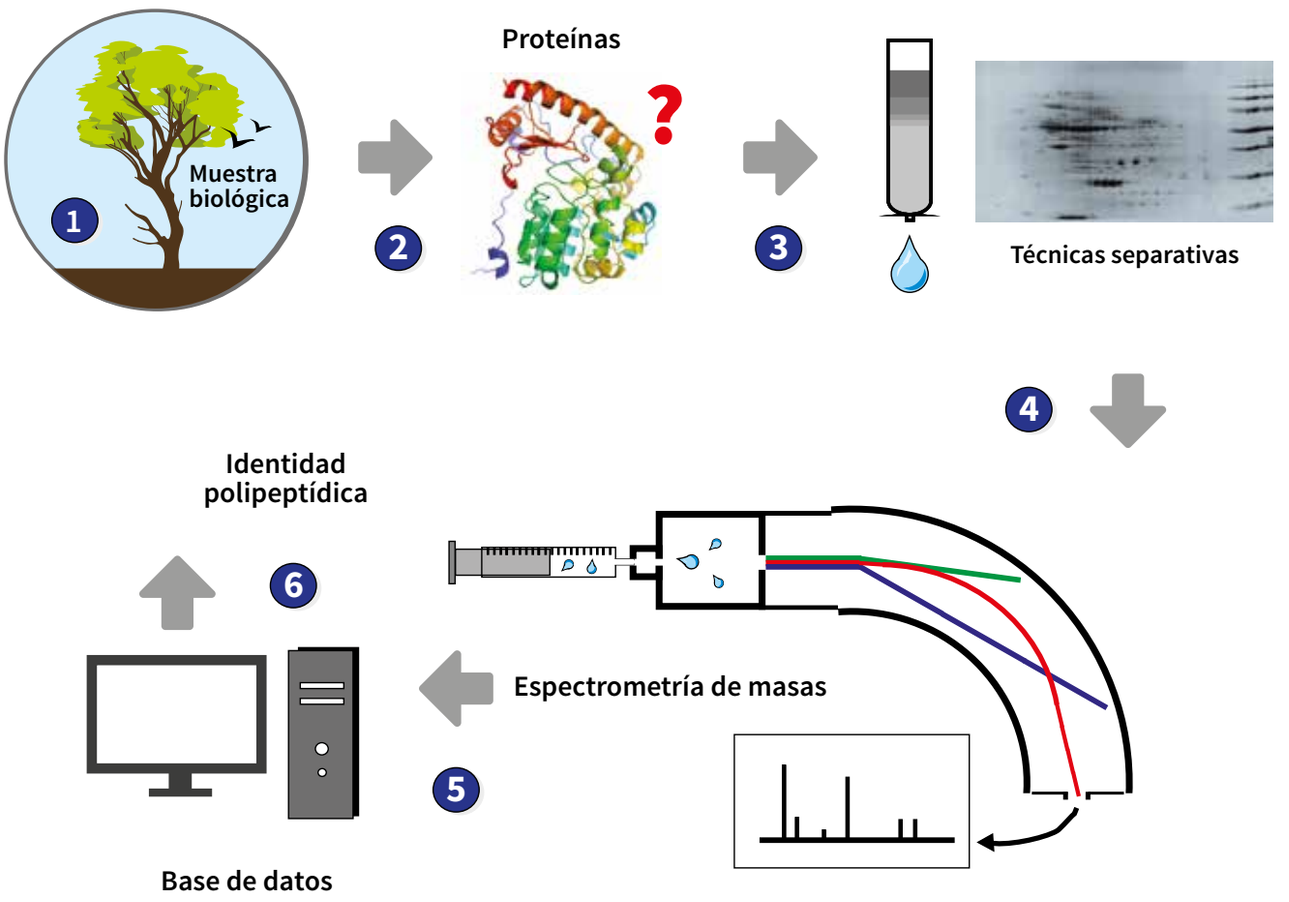


Figura 22.3. Flujo de trabajo para estudios proteómicos. 1. Toma de muestra (generalmente de individuos o tejidos de individuos, también de secretomas). 2. Aislamiento de proteínas. 3. Separaciones mediante cromatografía o electroforesis bidimensional (esta etapa puede llevarse a cabo de manera comparativa entre situaciones). 4. Fragmentación de polipéptidos y análisis mediante espectrometría de masas. 5. Análisis de resultados mediante aplicación de distintos tipos de *software* y comparación con bases de datos. 6. Determinación de la identidad de los polipéptidos presentes.

Fuente: Elaboración propia

la matemática, la estadística y la computación. La bioinformática es una ciencia de la información, ya que participa activamente en la organización y la transformación de datos, a partir de lo cual se renueva el conocimiento que se tiene sobre el objeto o el sistema en estudio.

La mayor parte de las ciencias que proveen datos a la bioinformática tienen una base esencialmente experimental. La interdisciplinariedad ha llegado a todas las áreas del quehacer "biológico", lo cual ha generado importantes cambios en paradigmas básicos. Como antes se describió, en las últimas décadas se ha incrementado de forma exponencial la capacidad de recoger datos en distintos niveles de organización: desde lo molecular hasta lo sistémico. El conocimiento de secuencias genómicas, por ejemplo, es técnicamente accesible de forma rápida y relativamente económica. Sin embargo, la información contenida en estas debe ser decodificada para alcanzar el conocimiento pleno y postular su aplicación en distintas áreas de interés.

Por otra parte, la bioinformática no solo tiene a su cargo el análisis de datos complejos mediante el uso de herramientas computacionales, sino que también se involucra en el diseño y mantenimiento de bases de datos que reunen, organizan y almacenan de forma estructurada la información biológica. Al mismo tiempo, la bioinformática define los estándares de los procedimientos que permiten acceder y recuperar de forma eficiente la información biológica almacenada. En la actualidad, prácticamente no existen procesos biológicos cuyo estudio no implique etapas previas o posteriores de análisis bioinformático.

La bioinformática y las disciplinas ómicas

Es incuestionable que la secuenciación mediante síntesis e incorporación de terminadores de cadena (dideoxiNTPs), también conocida como secuenciación de Sanger (Sanger et al., 1977a), dominó el proceso de secuenciación durante más de 20 años. Sin embargo, la necesidad del acceso al conocimiento de nuevas secuencias genómicas superó ampliamente los avances tecnológicos desarrollados durante esos años. Así, en paralelo con el auge creciente de lo que se llama "la era posgenómica", comenzaron a emerger las nuevas tecnologías de secuenciación antes mencionadas. En pocos años se fueron ofreciendo en el mercado nuevos métodos y equipos de secuenciación basados en tecnologías alternativas (tabla 22.1). Todas ellas permiten generar grandes volúmenes de datos (de millones a miles de millones de lecturas) en poco tiempo

Tabla 22.1. Tecnologías de secuenciación de segunda y tercera generación

Método	Medición	Nombre comercial	Referencia
Pirosecuenciación	Luz blanca (fotón)	FLX 454*	Margulies et al. (2006)
Síntesis (terminadores reversibles)	Fluorescencia	Illumina	Bentley (2006)
Ligación (octámeros fluorescentes)	Fluorescencia	Solid*	McKernan et al. (2009)
Síntesis (fluoróforos en 3')	Fluorescencia	Helicos*	Harris et al. (2008)
Síntesis (fluoróforo en los fosfatos)	Fluorescencia	PacBio	Eid et al. (2009)
Síntesis	Voltaje	Ion Torrent	Rothberg et al. (2011)
Flujo a través de un nanoporo	Voltaje	MinION	Stoddart, Heron, Mikhailova, Maglia, & Bayley et al. (2009)

* Descontinuada

Fuente: Elaboración propia

(desde unas pocas horas hasta un máximo de alrededor de diez días) y de forma económica (aproximadamente entre US$300 y US$1.500).

Los grandes volúmenes de datos producidos por NGS significan un reto enorme para la bioinformática: ¿cómo ordenar adecuadamente la mayor parte de las lecturas en información genómica de buena calidad? A este proceso se le llama *ensamblaje*, del cual existen dos alternativas procedimentales. Por un lado, se pueden ensamblar las lecturas respecto de un genoma de referencia para después mapearlas sobre la plantilla seleccionada con el fin de determinar su orden y solapamiento; por otro, se pueden ensamblar *de novo*. Para ello, se utilizan solo las lecturas obtenidas en la secuenciación masiva para generar los *contigs* (segmentos de secuencia derivados de lecturas contiguas) y los *scaffolds* más probables (unión de *contigs* vinculados por proximidad con base en variantes de la tecnología de secuenciación), sin compararlos *a priori* con ningún genoma de referencia.

En cualquiera de las dos alternativas, el paso final (denominado *finalización* o *terminación del genoma*) es el más laborioso, e implica la resecuenciación con métodos alternativos (por ejemplo, inicialmente con Illumina o Ion Torrent y después con PacBio) o el uso de PCR (*polymerae chain reaction*, 'reacción en cadena de la polimerasa') y secuenciación estándar de Sanger si las regiones desconocidas o de baja calidad son pocas y pequeñas en longitud.

La figura 22.4 resume el flujo de trabajo de un proceso de secuenciación genómica. El cambio de paradigma alcanzado con el advenimiento de la era posgenómica facilita la obtención inicial de los datos ómicos en múltiples niveles, pero el camino para su transformación en información útil y confiable no es corto (Aguilar-Bultet & Falquet, 2015; Glenn, 2011).

En la era posgenómica, las principales áreas de investigación con metodologías *high throughput* son las siguientes: la genómica, la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica, aunque el universo de las ómicas ha crecido tanto que se ha propuesto un lenguaje específico para identificar subáreas de trabajo (Greenbaum, Luscombe, Jansen, Qian, & Gerstein, 2001).

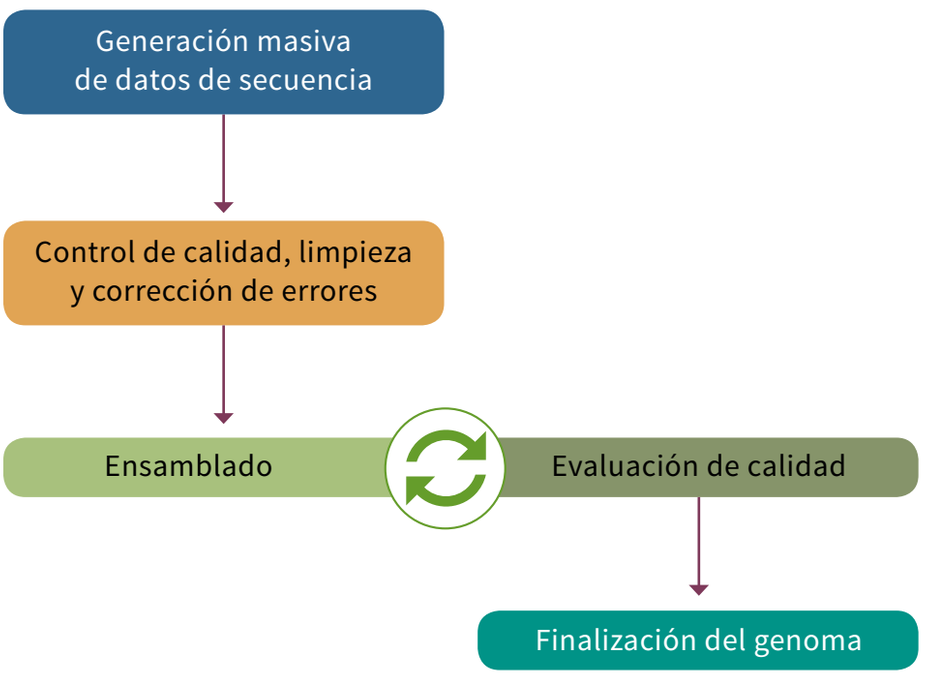


Figura 22.4. Esquema del procesamiento de datos obtenidos mediante secuenciación masiva. Las etapas de ensamblado y evaluación de calidad son iterativas hasta que se alcanza la calidad adecuada.

Fuente: Elaboración propia

La bioinformática y la transformación de datos en información

Con el objetivo de incrementar la eficacia de los potenciales agentes de control biológico, las tecnologías masivas actuales permiten recolectar grandes volúmenes de datos vinculados con los siguientes propósitos:

1. Identificar las características moleculares del agente de biocontrol.
2. Indagar acerca de las bases moleculares de propiedades diferenciales de cepas y variantes genéticas con diferente capacidad de control biológico.
3. Identificar y caracterizar las bases moleculares (genes, transcriptos, proteínas y rutas metabólicas) en cuanto a los modos de acción del agente de biocontrol.
4. Estudiar en forma integrada el sistema biológico de intervención, conformado por el agente de biocontrol, el hospedero y el resto de organismos presentes.

Sin embargo, aun cuando la obtención de datos masivos se ha facilitado (en tiempo y en dinero), el camino posterior para su organización e interpretación es una ardua tarea que requiere de la interacción y colaboración de diferentes grupos de investigación y organizaciones vinculadas con el mundo académico. Para facilitar esto, se ha logrado universalizar el acceso a la información obtenida a partir de trabajos previos, mediante la organización de bases de datos. Estas bases de datos cuentan con estructuras y contenidos alternativos que mejoran la calidad de las inferencias de "significado biológico" a partir de los datos recolectados en experimentos masivos. En síntesis, permiten una mejor transformación de los datos crudos en información biológica precisa. En la tabla 22.2, se listan algunas de las bases de datos que se han ido creando en el transcurso de las últimas tres décadas.

Con base en lo discutido, es posible mencionar que para todos estos temas existen múltiples ejemplos de trabajos de investigación en los cuales el aporte de las disciplinas ómicas y su interpretación bioinformática ha sido central (Conesa et al., 2016; Lorito, Woo, Harman, & Monte, 2010; Massart, Perazzolli, Höfte, Pertot, & Jijakli, 2015; Oshlack, Robinson, & Young, 2010; Van Lenteren, Bolckmans, Köhl, Ravensberg, & Urbaneja, 2017).

Tabla 22.2. Bases de datos de genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica

		Denominación y breve descripción	URL
Genómica	Ácidos nucleicos	**DDBJ** (DNA Data Base of Japan). Repositorio de secuencias de ADN a partir de cualquier tipo de sistema biológico y también de secuencias artificiales (sintéticas o patentes)	http://www.ddbj.nig.ac.jp/
		EMBL (European Molecular Biology Laboratories). Repositorio de secuencias de ADN a partir de cualquier tipo de sistema biológico y también de secuencias artificiales (sintéticas o patentes)	http://www.embl.org/
		GenBank. Repositorio de secuencias de ADN a partir de cualquier tipo de sistema biológico y también de secuencias artificiales (sintéticas o patentes)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/

(Continúa)

(Continuación tabla 22.2)

		Denominación y breve descripción	URL
Genómica	Genomas	**Ensembl**. Repositorio de información biológica de genomas grandes (humano, ratón, mosca de la fruta, pez cebra, etc.)	http://www.ensembl.org
		Ensembl Genomes. Repositorio de información biológica de otros sistemas biológicos (invertebrados, plantas, hongos, protistas, etc.)	http://ensemblgenomes.org/
		Patric (PathoSystems Resource Integration Center). Repositorio de genomas de bacterias patógenas	http://patricbrc.vbi.vt.edu/portal/portal/ patric/Home
		NMPDR (National Microbial Pathogen Data Resource). Repositorio de genomas de bacterias patógenas, principalmente del tipo B	http://www.nmpdr.org
		SGD (Saccharomyces Genome Database). Repositorio del genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, genes y productos codificados, fenotipos mutantes, etc.	http://www.yeastgenome.org
		VBRC (Viral Bioinformatics Resource Center). Almacena genomas virales. Contiene datos sobre siete familias de patógenos emergentes o reemergentes: Arenaviridae, Bunyaviridae, Filoviridae, Flaviviridae, Paramyxoviridae, Poxviridae y Togaviridae; y cinco familias adicionales: Adenoviridae, Asfarviridae, Baculoviridae, Herpesviridae e Iridoviridae.	http://www.biovirus.org/
		VectorBase. Repositorio del genoma de invertebrados que son vectores de patógenos humanos	http://www.vectorbase.org/
Transcriptómica	ARN	**Rfam**. Repositorio de información acerca de familias de ncRNA (non-coding RNA) y otros elementos de RNA estructurado	http://rfam.xfam.org
		miRbase. Repositorio de secuencias de micro-RNA y sus correspondientes anotaciones	http://www.mirbase.org/
		lncRNAdb. Contiene anotaciones sobre lncRNA (*eukaryotic long non-coding RNAs*)	http://www.lncrnadb.org/
		RDP (Ribosomal Database Project). Permite clasificar secuencias de rRNA 16S rápidamente y con certeza, de acuerdo con las últimas reglas taxonómicas propuestas en el *Manual de Bergey (Taxonomic outline of the Prokaryotes)*	http://rdp.cme.msu.edu/
		SRPDB (Signal Recognition Particle Database). Provee secuencias filogenéticamente ordenadas, alineadas y con anotaciones correspondientes a la estructura y función de las SRP	http://rth.dk/resources/rnp/SRPDB/
		tmRDB (Transfer-Messenger RNA Database). Provee secuencias filogenéticamente ordenadas, alineadas y con anotaciones correspondientes a la estructura y función de las tmRNP	http://www.ag.auburn.edu/mirror/tmRDB/

(Continúa)

(Continuación tabla 22.2)

		Denominación y breve descripción	URL
Proteómica	Expresión de proteínas	**Expression Atlas.** Repositorio de resultados de expresión génica a partir de más de 3.000 experimentos asociados con 40 organismos diferentes, incluyendo metazoarios y plantas	http://www.ebi.ac.uk/gxa/home/
		GEO (Gene Expression Omnibus). Repositorio público internacional que archiva y distribuye libremente datos de genómica funcional derivados de tecnologías de *high-throughput*	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/
		UniProt (Universal Protein Resource). Repositorio central de datos proteicos, secuencias y anotaciones funcionales. Es la combinación de las bases de datos Swiss-Prot, TrEMBL y PIR-PSD	http://www.uniprot.org/
		PIR (Protein Information Resource). Repositorio para asistir a los investigadores en la identificación e interpretación de información relacionada con secuencias proteicas	http://pir.georgetown.edu/
		Swiss-Prot. Repositorio que provee secuencias proteicas con anotación exhaustiva (descripción de función, estructura de sus dominios, modificaciones postraduccionales, variantes proteicas, etc.), con un nivel mínimo de redundancia y con integración con otras bases de datos	http://www.expasy.org/sprot
		Pedant (Protein Extraction, Description and Analysis Tools). Provee un análisis automatizado exhaustivo de secuencias genómicas con una gran variedad de herramientas bioinformáticas	http://pedant.gsf.de
		Prosite (Protein Sites). Es una base de datos de proteínas que describe familias proteicas, dominios y sitios funcionales, así como los patrones y perfiles aminoacídicos presentes en ellas	http://prosite.expasy.org
		Pfam (Protein families). Base de datos que incluye dominios y familias proteicas. Pfam-A almacena un alineamiento múltiple y un modelo oculto de Markov. Pfam-B se generó automáticamente y contiene un gran número de pequeñas familias. Pfam-B es útil cuando no se detecta ninguna familia en Pfam-A	http://pfam.xfam.org
		InterPro. Base de datos de familias proteicas, dominios y sitios funcionales. El contenido de InterPro está basado en firmas moleculares y en las proteínas que tienen similitud significativa con ellas. Las firmas moleculares consisten en modelos simples (expresiones regulares) o más complejos (modelos ocultos de Markov)	http://www.ebi.ac.uk/interpro/
		Prints (Protein Fingerprints). Colección de *fingerprints* con anotación detallada para las familias proteicas y con herramientas de diagnóstico para usar con secuencias nuevas	http://www.bioinf.manchester.ac.uk/dbbrowser/PRINTS/
		ProDom (Protein Domains). Base de datos de familias proteicas construida automáticamente mediante el agrupamiento de segmentos homólogos (*clustering*)	http://prodom.prabi.fr/prodom/current/html/home.php

(Continúa)

(Continuación tabla 22.2)

		Denominación y breve descripción	URL
Proteómica	Estructuras proteicas	**PDBe & PDBj** (Protein Data Bank Europe o Protein Data Bank Japan). Repositorio de datos de estructuras 3D de moléculas biológicas grandes (especialmente proteínas)	http://www.pdbe.org
		CATH (CATH Protein Structure Classification). Contiene una clasificación jerárquica de dominios proteicos basada en sus estructuras	http://www.cathdb.info/
		SCOP2 (Structural Classification of Proteins, sucesor de la base de datos SCOP). Su principal objetivo son las proteínas estructuralmente caracterizadas y depositadas en el PDB. Las proteínas están organizadas con base en sus relaciones estructurales y evolutivas	http://scop2.mrc-lmb.cam.ac.uk/
		RCSB PDB. Base de datos orientada a la biología estructural. Provee herramientas de búsqueda y análisis de las estructuras	http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do
	Modelos proteicos	**Swiss-Model.** Servidor web de bioinformática estructural dedicado al modelado por homología de estructuras proteicas 3D	http://swissmodel.expasy.org
		ModBase. Base de datos de modelos proteicos prolijamente anotados. Contiene más de 3,8 millones de secuencias proteicas únicas	http://salilab.org/modbase
		PMP (Protein Model Portal). Desarrollado para facilitar el acceso a un uso efectivo de los datos de modelos 3D en la investigación biomédica	http://www.proteinmodelportal.org/
	Identificación proteica	**Pride** (Proteomics Identifications). Repositorio centralizado de datos proteómicos. Incluye la identificación de proteínas y péptidos, modificaciones postraduccionales y evidencias espectrofotométricas de soporte	http://www.ebi.ac.uk/pride/archive/
		GelMap. Herramienta universal para la visualización de *spots* en la imagen de un gel 2D. Almacena mapas de referencia y permite identificar proteínas por sus características de migración en geles 2D	http://www.genetik.uni-hannover.de/pflanzenproteomik.html
	Interacciones proteína-proteína y otras	**BIND** (Biomolecular Interaction Network Database). Repositorio de datos de interacción proteica acompañados de información funcional e información bibliográfica	http://bond.unleashedinformatics.com/
		BioGRID (Biological General Repository for Interaction Datasets). Colección manualmente corregida de interacciones entre macromoléculas	http://thebiogrid.org/

(Continúa)

(Continuación tabla 22.2)

		Denominación y breve descripción	URL
Proteómica	Interacciones proteína-proteína y otras	**CCSB**. Repositorio de interacciones binarias proteína-proteína de varios sistemas: *H. sapiens*, *A. thaliana*, *S. cerevisiae*, *C. elegans*, virhostoma (polyomavirus/hospedador, papillomavirus/hospedador, adenovirus/hospedador y Epstein-Barr/hospedador) y fragmentoma. El fragmentoma se basa en proteínas modulares (con dominios que se pliegan independientemente) que pueden establecer un mismo tipo de interacción aun cuando estén acopladas en dominios diferentes.	http://interactome.dfci.harvard.edu/
		DIP (Database of Interacting Proteins). Base de datos biológicos que organiza y cataloga interacciones proteína-proteína experimentalmente determinadas	http://dip.doe-mbi.ucla.edu/
		IntAct. Base de datos de interacciones moleculares, que incluyen proteína-proteína, proteína-pequeñas moléculas y proteína-ácidos nucleicos	http://www.ebi.ac.uk/intact/site/index.jsf
		String (Search Tool for Recurring Instances of Neighbouring Genes). Es una base de datos de interacciones proteína-proteína, determinadas experimentalmente o predichas	http://string.embl.de/
		MINT (Molecular INTeraction). Está enfocada exclusivamente en interacciones proteína-proteína verificadas de forma experimental	http://mint.bio.uniroma2.it/mint/Welcome.do
		iRefWeb. Web de interfaz que permite acceder a datos de interacción proteica consolidados a partir de diez bases de datos públicas: BIND, BioGRID, Corum, DIP, IntAct, HPRD, MINT, MPact, MPPI y OPHID	http://wodaklab.org/iRefWeb/
		BioCyc Database Collection. Conjunto de más de 5.000 bases de datos con información específica de genomas y rutas metabólicas. Comprende MetaCyc, HumanCyC, EcoCyc, AraCyC, YeastCyc, LeishCyc y TrypanoCyc	http://biocyc.org/
Metabolómica	Enzimas	**Brenda**. Fuente electrónica de información molecular y bioquímica sobre las enzimas que han sido clasificadas por la IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology)	http://www.br (enda-enzymes.org
		Manet Database (Molecular Ancestry Network). Base de datos bioinformáticos que mapea las relaciones evolutivas de la arquitectura proteica directamente sobre las redes biológicas	http://www.manet.uiuc.edu/

(Continúa)

(Continuación tabla 22.2)

		Denominación y breve descripción	URL
Metabolómica	Redes metabólicas	**Kegg Pathway Database** (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Colección de bases de datos relacionadas con genomas, rutas metabólicas, enfermedades, drogas y sustancias químicas	http://www.kegg.jp
		Metabolights. Base de datos de experimentos metabolómicos y la información derivada	http://www.ebi.ac.uk/metabolights/
		MetaNetX. Servidor que posibilita la construcción automatizada de modelos de redes metabólicas a gran escala y la anotación genómica correspondiente	http://metanetx.org/
		SMPDB (Small Molecule Pathway Database). Base de datos interactiva que contiene más de 600 rutas metabólicas de moléculas pequeñas detectadas en *Homo sapiens*	http://smpdb.ca/
	Metabolitos pequeños	**HMDB** (Human Metabolome Database). Contiene información detallada acerca de metabolitos pequeños hallados en el cuerpo humano	http://www.hmdb.ca/
		YMDB (Yeast Metabolome Database). Contiene información detallada y manualmente verificada de metabolitos pequeños hallados en o producidos por *Saccharomyces cerevisiae*	http://www.ymdb.ca/
		ECMDB (Escherichia Coli Metabolome Database). Contiene información detallada y manualmente verificada de metabolitos pequeños hallados en o producidos por *Escherichia coli*	http://www.ecmdb.ca/

Fuente: Elaboración propia

Impacto de las tecnologías biológicas de alto rendimiento en el control biológico

Las disciplinas ómicas han tenido un impacto trascendente en todas las ramas científico-tecnológicas. Los avances en el modelado de los sistemas biológicos, en los estudios de genómica funcional, en las herramientas bioinformáticas que apoyan la producción de información a partir de datos experimentales y en los procedimientos de ingeniería genética de la era posgenómica han producido una extraordinaria revolución en la agricultura y le permiten al ser humano una cantidad importante de aplicaciones concretas (Thao & Tran, 2016). Por ejemplo, gracias a las NGS se puede conocer la relación ancestral de las variedades de plantas que cultivamos (Brozynska et al., 2017), describir el microbioma de la rizosfera que favorece la fijación de nutrientes (Mitter, De Freitas, & Germida, 2017) o ayudar en la completa identificación de virus que comprometen la sanidad vegetal (Rozado-Aguirre, Adams, Fox, Dickinson, & Boonham, 2017). También, es posible conocer el genoma de los invertebrados plaga (con toda la variabilidad pangenómica de las especies circulantes) (Xie et al., 2017) y de sus enemigos naturales (otros invertebrados, bacterias, hongos y virus biocontroladores), como es el caso de un nucleopoliedrovirus colombiano que infecta larvas de *Spodoptera frugiperda*, cuyo análisis genómico reveló la ocurrencia en la naturaleza de fenómenos de

transferencia horizontal de genes (Barrera, Belaich, Patarroyo, Villamizar, & Ghiringhelli, 2015).

Además, se puede comprender cómo atacan y cómo se defienden los organismos presentes en nuestros agroecosistemas, lo cual revela qué moléculas y funciones se expresan ante determinadas circunstancias fisiopatológicas mediante diferentes aproximaciones: transcriptómicas, por ejemplo, que ayudaron en el descubrimiento de los genes asociados a la resistencia insecticida en *Bactrocera dorsalis* (Hsu et al., 2012); proteómicas, que sirven, por ejemplo, para controlar el crecimiento y el desarrollo de las plantas, así como para entender sus respuestas a estreses bióticos y abióticos (Tan, Lim, & Lau, 2017); y metabolómicas, que, entre otras aplicaciones, ayudaron a entender los efectos de algunos pesticidas sobre los vegetales que consumimos (Zhao, Huang, Adeleye, & Keller, 2017).

En referencia particular al control biológico, las herramientas ómicas posibilitan caracterizar en términos moleculares los ingredientes activos que conforman formulaciones bioplaguicidas, es decir, ingredientes activos de los entomopatógenos y antagonistas de fitopatógenos (por ejemplo, virus, bacterias, hongos o nematodos). De este modo, se facilita la elección de los mejores candidatos, su posterior registro y su seguimiento en campo. Las herramientas ómicas también son de vital importancia para el reconocimiento de las especies o biotipos de los organismos plaga en los cultivos (fitopatógenos y fitófagos) y para la descripción de las huellas metabólicas derivadas de las interacciones entre pares de una misma especie o con las especies que utilizan como alimento.

Genómica y control biológico

La genómica es el estudio integral del funcionamiento, el contenido, la evolución y el origen de los elementos genéticos de un organismo (cromosomas y plásmidos). El estudio de los genomas de microorganismos ha permitido identificar los mecanismos genéticos responsables de sus características fisiológicas relevantes: las capacidades enzimáticas de degradación, factores de virulencia, mecanismos de reconocimiento de hospederos, producción de fitohormonas y control de patógenos, entre otros. Esta identificación del potencial fisiológico se basa en los principios de la ruta central de la biología molecular, que establece que el flujo de la información en los organismos vivos parte de los genes en los cromosomas y se traduce en forma de función (proteínas) y estructura (células) (Crick, 1970). Por lo tanto, si se conoce la composición genética, es posible determinar el potencial del organismo.

Los genomas también pueden utilizarse para identificar los cambios genéticos, como la adquisición y pérdida de genes, o las ganancias o deleciones microestructurales, factores que pueden alterar de manera drástica o sutil las funciones celulares. Dichos cambios modulan las capacidades metabólicas de los organismos y determinan su funcionalidad en los ambientes, por ejemplo, la patogenicidad. Además, debido a que el genoma contiene todas las mutaciones acumuladas a través de la historia evolutiva del organismo, puede usarse para dilucidar de un mejor modo su procedencia.

El uso de aproximaciones de anotación bioinformática multinivel permite reconstruir las capacidades metabólicas primarias de los organismos a partir de la información genómica. Estas reconstrucciones son posibles gracias a la caracterización experimental de múltiples genes microbianos, la gran acumulación de información genómica en las bases de datos y el desarrollo de herramientas que permiten predecir funciones por medio de búsqueda de homología y algoritmos *ab initio* (como InterProScan) o crear mapas metabólicos (como KEGG) (tabla 22.2). La base de datos de KEGG, por ejemplo, es un recurso que permite el entendimiento de alto nivel de las funciones de los sistemas biológicos. Por otro lado, BioCyc es una colección de cerca de 7.667 rutas metabólicas basadas en genomas generadas con el programa de reconstrucción Pathway Tools de la compañía SRI International (Caspi et al., 2009). Estas aproximaciones aún no son perfectas, pero permiten generar hipótesis que, en conjunto con la información experimental, posibilitan la identificación y potenciación de genes asociados a una función de interés.

La reconstrucción funcional y estructural a partir de la información genómica ha permitido, entre otras cosas, guiar la manipulación genética para favorecer metabolitos de interés biotecnológico, entender las capacidades del metabolismo central y estructural que

distinguen un aislamiento nuevo de aquellos más cercanos, fortalecer la descripción de nuevas especies (Konstantinidis & Tiedje, 2005) y mejorar las técnicas de aislamiento y cultivo. A pesar de la enorme ventaja que ofrece la caracterización genómica en el control biológico, es importante señalar que la reconstrucción fisiológica representa una hipótesis de la funcionalidad y que este es un borrador con varios sesgos. Uno de los mayores inconvenientes en la asignación de funciones es la falta de caracterizaciones de genes correspondientes al metabolismo secundario que puedan ser relacionados con funciones biocontroladoras.

Por otro lado, la secuenciación genómica puede servir como una hoja de ruta para la caracterización profunda de organismos élites con potencial de bioprospección en el control biológico. Esto se ha demostrado en microorganismos para el control de insectos plaga (Barrera et al., 2015; Cuartas et al., 2015) y en el control de fitopatógenos (revisado por Massart et al., 2015) como *Pseudomonas protegens* Pf-5 (Paulsen et al., 2005). Esta bacteria, por ejemplo, es reconocida en el campo del control biológico como uno de los controladores de referencia por la gran variedad de enfermedades que suprime. *Pseudomonas* Pf-5 se aisló por primera vez de la rizosfera del algodón, y se ha estudiado ampliamente debido a su capacidad supresora de enfermedades causadas en las plántulas de algodón por *Rhizoctonia solani* (Howell & Stipanovic, 1979) y por *Pythium ultimum* (Howell & Stipanovic, 1980). Estos patógenos son causantes de la podredumbre de las semillas y la muerte de las plántulas del algodón y de muchas otras plantas. Además de los patógenos ya mencionados, Pf-5 suprime otros hongos patógenos transmitidos por el suelo o por residuos. Por ejemplo, en el residuo de la paja de trigo, Pf-5 suprime la formación de ascocarpos del patógeno de manchas de trigo (*Pyrenophora tritici-repentis*), lo cual disminuye la carga de inóculo disponible para la reinfección.

La amplia evidencia de *Pseudomonas protegens* Pf-5 como agente biocontrolador ha despertado un enorme interés en la caracterización de los mecanismos genéticos involucrados en la actividad controladora. Estudios iniciales permitieron la identificación de una región genómica requerida para la producción de antibióticos como la pioluteorina (Kraus & Loper, 1995). Este es un antibiótico poliquétido aromático producido por varias especies de *Pseudomonas* que suprimen las enfermedades de las plantas causadas por hongos fitopatógenos. Esta caracterización mostró el gran potencial derivado del estudio genético y señaló la necesidad de analizar la secuencia del genoma completo, lo que se logró casi una década después (Paulsen et al., 2005).

El genoma de Pf-5 tiene un tamaño de 7,07 Megabases (Mb), lo cual lo ubica como uno de los más grandes descritos para la especie. Esta dimensión refleja la adaptación al estilo de vida como comensal de otro organismo y muestra una buena capacidad de respuesta a los cambios ambientales. El genoma de Pf-5 tiene una extensa colección de genes reguladores, algunos de los cuales se han caracterizado por sus papeles en la regulación de la producción de metabolitos secundarios o en el control biológico. De manera consecuente con su estilo de vida comensal, Pf-5 parece carecer de una serie de factores de virulencia y de patogenicidad que se encuentran en los patógenos de las plantas. Además de las seis rutas de metabolitos secundarios conocidos producidos por Pf-5, tres nuevos clústeres podrían contribuir al control biológico.

Así, la secuencia genómica ha proporcionado numerosas pistas sobre los mecanismos utilizados por la bacteria para sobrevivir en la espermosfera y en la rizosfera. Estas características incluyen una amplia capacidad catabólica y de transporte para la utilización de exudados de semillas y raíces, una gran colección de sistemas de eflujo para la defensa contra el estrés ambiental y la competencia microbiana, y la presencia de 45 receptores de membrana externa que deberían permitir la absorción de hierro a partir de una amplia gama de sideróforos producidos por microorganismos del suelo (Paulsen et al., 2005). Estudios como este muestran el enorme potencial que posee la secuenciación genómica y su posterior interpretación bioinformática, para dilucidar los mecanismos eventualmente responsables de las actividades de control biológico.

Transcriptómica y control biológico

En la naturaleza, las plantas hospederas y sus comunidades microbianas circundantes tienden a adaptarse a medida que se producen cambios ambientales y

ecológicos. Cuando los microorganismos y las células individuales de los organismos superiores perciben, mediante la perturbación de receptores, las diferentes señales químicas o físicas del ambiente, desencadenan una respuesta funcional en la que intervienen principalmente los reguladores de transcripción y los actuadores apropiados. Los mecanismos asociados con la percepción, transmisión y procesamiento de la información ambiental se basan en complejas interacciones moleculares. Si bien nuestra comprensión de estas respuestas es limitada, es lógico suponer que la mala regulación en cualquiera de las etapas del procesamiento de la información ambiental podría conducir a resultados adversos para el organismo en cuestión.

Debido a esto, el perfil transcripcional de las respuestas orgánicas al medioambiente puede ser muy informativo, pues proporciona una plataforma para desentrañar las bases moleculares de la adaptación de los seres vivos.

Ningún organismo se desarrolla en un estado aislado, y las asociaciones entre las plantas y microorganismos son muy diversas: estas suceden en el suelo, en las superficies foliares y también dentro de la planta. Dichas interacciones pueden ser beneficiosas, neutrales o perjudiciales con respecto al crecimiento vegetal, la salud y el desarrollo; además, en los sistemas agrícolas, también afectan el rendimiento. Los avances recientes en las tecnologías de secuenciación han acelerado la capacidad de rastrear los cambios globales en las transcripciones y de identificar las intrincadas interacciones que pueden correlacionarse con los resultados fisiológicos de las relaciones planta-microbios.

Los enfoques de secuenciación NGS, tales como la secuenciación de ARN dual y la metatranscriptómica, permiten un análisis imparcial para identificar los genes expresados diferencialmente e incluso permiten identificar cambios en los eventos de regulación transcripcional. Massart et al. (2015) realizaron una revisión sobre estudios relevantes en el control biológico de fitopatógenos y la importancia de las aproximaciones ómicas en modelos *in vitro* e *in planta*. En los siguientes apartados de esta sección se destacan los estudios que han utilizado el análisis de perfiles de transcripción global para descubrir fenómenos naturales que conducen al control biológico tanto de patógenos microbianos como de insectos plaga.

Transcriptómica en el control de fitopatógenos

Las investigaciones relacionadas con las interacciones planta-patógeno son un campo en rápida expansión debido a las pérdidas de rendimiento que dichas interacciones pueden generar en la producción agrícola. Aunque la resistencia a las enfermedades de las plantas suele ser robusta en la protección que el genoma proporciona contra los invasores microbianos, las adaptaciones coevolutivas en los patógenos de las plantas pueden propiciar la aparición de enfermedades (Anderson et al., 2010).

Por ejemplo, el cultivo de *Brassica napus* (canola) se ve fuertemente afectado por el patógeno fúngico *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causante de la pudrición del tallo de canola. En la actualidad, no existe un germoplasma resistente a esta enfermedad y su ataque depende de la existencia de genes para resistencia cuantitativa o incompleta (Margulies et al., 2006; Wu et al., 2013), lo que convierte en una prioridad el descubrimiento y caracterización de agentes de control biológico. Recientemente, Duke et al. (2017) describieron los efectos de *Pseudomonas chlororaphis* PA23 sobre *B. napus* en presencia de *S. sclerotiorum*, cuyas tasas de infección se redujeron en un 91 %. Este trabajo documentó la reprogramación transcripcional en canola mediante el análisis de ARN, después del tratamiento con el patógeno, el controlador biológico o la interacción de ambos. Así, demostraron que el tratamiento con *S. sclerotiorum* indujo la regulación positiva de aproximadamente 8.000 genes en la canola, mientras que el pretratamiento con el biocontrolador *P. chlororaphis* PA23 redujo 16 veces la expresión de los genes regulados (aproximadamente 500). En ausencia del patógeno, se observó que *P. chlororaphis* PA23 indujo redes de defensa en plantas y también reguló la resistencia sistémica adquirida y la producción de especies reactivas de oxígeno. Este trabajo proporcionó un marco para establecer las bases moleculares de la estimulación de resistencia en la canola con *P. chlororaphis* y abrió una ventana para usar la resistencia sistémica adquirida en el manejo de la enfermedad.

Otro ejemplo de análisis funcional de agentes de control biológico es el logrado en el control de la enfermedad poscosecha conocida como *moho azul*, la

cual es causada por el hongo filamentoso *Penicillium expansum* en frutos (manzanas y peras, por ejemplo). Durante el progreso de esta enfermedad, se produce la micotoxina patulina, que se asocia con efectos genotóxicos, teratogénicos e inmunotóxicos en los mamíferos, por lo cual es un riesgo para la salud de los que consuman las frutas infectadas (Moake et al., 2005; Puel et al., 2010).

El método actual para controlar las infecciones por *P. expansum* es el tratamiento con fungicidas. Pero debido a que la ingesta de estas sustancias también está relacionada con riesgos, el tratamiento con agentes de control biológico, como la levadura detoxificante de patulina *Sporobolomyces* sp., es una estrategia prometedora (Mahunu et al., 2016). Para obtener información sobre los mecanismos asociados con la degradación de la patulina, Ianiri et al. (2016) monitorearon los cambios transcripcionales de *Sporobolomyces* sp. (cepa IAM 13481) tras la incubación con patulina, mediante secuenciación de ARN. Los resultados mostraron que este tratamiento condujo a la producción de especies reactivas de oxígeno y a respuestas al estrés oxidativo. Además, documentaron la regulación transcripcional de genes asociados con procesos de oxidación-reducción y transporte durante la detoxificación y expulsión de la patulina de la célula. Estos autores también propusieron que la patulina se conjuga con el glutatión por proteínas del tipo glutatión S-transferasas, las cuales son reguladas positivamente antes de la carga por transportadores ABC específicos de patulina-glutatión para su degradación no específica en vacuolas. No obstante, a pesar de lo detallado y complejo de estos mecanismos, aún no se ha determinado la evidencia experimental de tales actividades. Sin embargo, la secuenciación de ARN es una poderosa herramienta para plantear rápidamente hipótesis conducentes a desarrollar de un mejor modo la experimentación en el laboratorio.

Dentro de otros casos, cabe mencionar los hallazgos con especies del género *Trichoderma* descritas como simbiontes avirulentos de plantas que funcionan como antagonistas de muchos hongos fitopatógenos, lo cual mejora, en consecuencia, la sanidad del vegetal. Este hongo —que tiene una amplia distribución mundial (Vinale et al., 2008)— incluye muchas especies que han sido bien documentadas tanto por sus propiedades de control biológico como por su actividad promotora del crecimiento vegetal (Hermosa et al., 2012; Matarese et al., 2012; Ryder et al., 2012). Aunque se ha demostrado que varias cepas de este hongo son funcionales para uno u otro objetivo, la cepa GD12 de *Trichoderma hamatum* mostró tener ambas propiedades (Ryder et al., 2012).

En tal sentido, Shaw et al. (2016) realizaron un análisis de la progresión de las respuestas transcripcionales de este microorganismo mediante la secuenciación del ARN. La evaluación se realizó durante la promoción del crecimiento de la lechuga y el control biológico del patógeno *S. sclerotiorum*, durante 15 días, con 6 puntos de muestreo en el tiempo.

Este experimento se realizó en bandejas tipo semillero de seis pozos (macetas) con suelo, y los tratamientos fueron suelo con *T. hamatum*, suelo con *S. sclerotiorum* y suelo con *T. hamatum* y *S. sclerotiorum*. En todos los casos, cada pozo contenía una sola plántula de lechuga. La secuenciación de ARN se realizó los días 1, 2, 4, 5, 10 y 15. Los resultados mostraron que *T. hamatum* GD12 tiene un perfil transcripcional distinto cuando se cultiva en presencia de *S. sclerotiorum*, con expresión de genes que incluyen transportadores, factores de oxidación-reducción y una destacada representación de sideróforos. Además, durante el antagonismo de *S. sclerotiorum*, se encontró que un grupo de proteínas secretadas ricas en cisteína funcionaron como moléculas efectoras potenciales, las cuales podrían afectar el control biológico y la promoción del crecimiento de las plantas, también reguladas positivamente. Este estudio proporcionó un informe detallado de la cinética de la reprogramación transcripcional durante el control biológico y la promoción del crecimiento de las plantas, información que ha abierto una puerta a la caracterización funcional de rasgos microbianos de importancia agrícola.

Transcriptómica en el control de insectos

Además de los agentes de control biológico que se estudian y desarrollan para combatir los patógenos vegetales, también se buscan activamente micro-organismos para el control de insectos dañinos para los cultivos. Las especies del hongo cosmopolita del suelo *Metarhizium* han sido reconocidas por su potencial

para controlar artrópodos. De hecho, Novozymes ha comercializado un producto deno-minado Met52, el cual es una formulación de la cepa F52 de *Metarhizium anisopliae* que tiene actividad insecticida, sin riesgos toxicológicos o restricciones de cosecha. En algunos países, el Met52 está incluso registrado para su uso en la agricultura ecológica. Algunos insectos blanco de Met52 incluyen varias garrapatas y escarabajos, gorgojos de las raíces, moscas, mosquitos, trips, langostas y saltamontes como hospederos.

En un informe de Gao et al. (2011), los enfoques de secuenciación de ARN se utilizaron para comparar las primeras respuestas transcripcionales de *M. anisopliae* y *Metarhizium acridum* durante la infección de langostas y cucarachas, respectivamente. El objetivo del estudio fue comprender mejor los eventos tempranos en la germinación de esporas de hongos, la adhesión a la cutícula de los insectos, la penetración y la formación de apresorios. Si bien existen algunas superposiciones en patrones de expresión, tales como transcripciones asociadas con traducción y modificaciones del tipo postraduccional, los dos hongos difirieron entre sí.

Los autores propusieron que las dos especies de *Metarhizium* spp. estudiadas tienen mecanismos finamente perfeccionados para regular la diferenciación celular en presencia de diferentes insectos y para reconocer diversos estímulos relacionados con las cutículas del hospedero. Estos eventos de reconocimiento utilizarían vías de señalización que implican receptores acoplados a proteína G, vías de señalización dependientes de calcio y MAP quinasas que dirigen la expresión de proteasas secretadas y grupos de genes asociados con la síntesis de metabolitos secundarios.

Se ha encontrado que *M. anisopliae* tiene una fuerte actividad biocontroladora de insectos plaga, sin embargo, existe evidencia de que langostas migratorias gregarias tienen mayor sobrevivencia en respuesta al tratamiento con *M. anisopliae* que aquellas que viven en solitario (Wilson et al., 2002). Para ampliar la comprensión de este fenómeno, Wang et al. (2013) llevaron a cabo experimentos de secuenciación de ARN a fin de resaltar la expresión diferencial que sustenta la longevidad de las langostas gregarias después de la infección con *M. anisopliae*. Al analizar los datos de secuenciación, encontraron que las langostas solitarias susceptibles dedicaban casi el doble de la cantidad de genes para combatir el patógeno fúngico en comparación con sus pares gregarios. Por otra parte, las langostas gregarias exhibieron niveles elevados en la expresión de genes relacionados con la defensa, tales como receptores de reconocimiento, inhibidores de proteasas y factores antioxidantes. Por ejemplo, la proteína de reconocimiento GNBP3 se une a β- (1,3) glucanos, un componente importante de la pared celular de hongos, y activa las respuestas sistémicas antifúngicas del hospedero (Matskevich et al., 2011).

La caracterización posterior por Wang et al. (2013) reveló que GNBP3 aumenta la susceptibilidad a la proteólisis durante la infección por *M. anisopliae*, presumiblemente liberando PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos). Estas son moléculas inductoras de respuestas de defensa en las plantas, que en este caso actúan contra las langostas. Por otro lado, se ha observado que el silenciamiento mediado por ARN de interferencia contra ARNm producidos por el gen GNBP3 reduce efectivamente la vida media de las langostas gregarias durante la infección con *M. anisopliae*, lo cual indica que la respuesta inmune dependiente de GNBP3 es crítica para la inducción de la resistencia en estos animales.

Conclusiones

Antes del advenimiento de las tecnologías de secuenciación del ADN, los genetistas y los biólogos moleculares se basaron en el cribado de grandes colecciones de organismos mutantes para identificar genes implicados en funciones biológicas específicas. Esto se logró a menudo mediante la inducción química de mutaciones aleatorias y la caracterización de los mutantes, seguidas por amplios procedimientos de clonación basada en mapas para aislar genes específicos implicados en el proceso de interés. En conjunto, estas técnicas tomaban años de duro trabajo.

Hoy en día, afortunadamente, mediante la ejecución de experimentos controlados de manera adecuada, seguidos por la extracción y secuenciación de ácidos nucleicos, se puede revelar rápidamente cuáles son los genes (la información) implicados en cada uno de los

fenómenos biológicos. Los beneficios de la transcriptómica son claros, dado que una vez identificados los genes críticos para un proceso biológico en particular, se pueden desarrollar tamizajes de alto rendimiento basados en la expresión de o en actividades asociadas con genes particulares.

A pesar de las grandes ventajas, los perfiles transcriptómicos presentan desafíos, que incluyen la necesidad de confirmar experimentalmente las funciones de los genes identificados para ser considerados biológicamente relevantes en un proceso determinado. Además, este trabajo requiere de científicos con capacitación especial, cuya atención a la bioinformática, la estadística y la manipulación de grandes conjuntos de datos es fundamental. Sin embargo, la disponibilidad de bases de datos y de programas computacionales para la manipulación de la secuencia y su análisis estadístico puede facilitar el proceso, lo cual hace accesible la herramienta para muchos científicos de todo el mundo.

Proteómica y control biológico

En los seres vivos, las proteínas son las moléculas protagonistas, encargadas de llevar a cabo las principales funciones celulares. Esta particularidad se debe, sin duda, a la diversidad de aminoácidos que conforman su alfabeto. De hecho, la diferente composición secuencial y la longitud de los polipéptidos naturales determinan la conformación de estructuras complejas y diversas, cuyos residuos constitutivos exponen sus distintos grupos químicos, modifican los entornos y otorgan oportunidades de interacción con grados diferenciales de afinidad con otras moléculas y átomos.

Esta característica composicional de las proteínas hace que puedan intervenir en numerosas y variadas actividades (incluso variables de acuerdo con las condiciones de contorno y la presencia de otras proteínas). También hace posible el establecimiento de vínculos estrechos con diferentes biomoléculas o iones metálicos para conformar vías metabólicas, rutas de señalización o estructuras complejas, entre otras posibilidades que han evolucionado en la naturaleza. Es de destacar que, en muchos organismos, un solo tipo de proteína individual (o su cantidad relativa) es el responsable de un rasgo fenotípico útil para una aplicación biotecnológica. En cambio, en otras situaciones, la proteína solo es un miembro de una red diversa que, en su trabajo coordinado y conjunto, define el aspecto morfológico o fisiológico de interés científico.

Por tales razones, el estudio proteómico es esencial para la postulación y posterior formulación de agentes de biocontrol en agricultura, dado que puede ayudar en la comprensión de los mecanismos de interés.

Proteómica en el control de fitopatógenos

Existen reportes sobre el uso de herramientas proteómicas encaminadas a elucidar los mecanismos de acción de los agentes de control biológico de fitopatógenos. Estas técnicas han sido aplicadas para identificar proteínas asociadas a la función biocontroladora y así comprender y determinar cuáles son los procesos involucrados. Un ejemplo reciente en esta línea de estudios es el trabajo llevado a cabo con el micoparásito *Aspergillus aculeatus* Asp-4, un agente de biocontrol que coloniza y degrada esclerocios de *S. sclerotiorum*, reduce la germinación de estas estructuras y, por ende, la enfermedad causada por este patógeno que afecta alrededor de 400 especies de plantas en todo el planeta (Hu et al., 2017).

Además de emplear metodologías transcriptómicas, los autores aplicaron un estudio proteómico consistente en la extracción de proteínas totales a partir *A. aculeatus* Asp-4 cultivados en presencia o ausencia de esclerocios triturados de *S. sclerotiorum*, para luego proceder a su separación mediante electroforesis bidimensional y a la posterior identificación de los polipéptidos diferenciales empleando espectroscopía de masas del tipo MALDI-TOF. Estos estudios comparativos de los perfiles proteicos permitieron determinar que 93 proteínas habían mostrado un incremento en su expresión cuando el micoparásito había crecido sobre los esclerocios triturados (quitinasas, proteasas, lipasas, porinas, proteínas del metabolismo energético y oxidoreductasas, entre otras), mientras que 73 habían disminuido su presencia (proteínas de respuesta a estreses bióticos y abióticos). De este modo, la información proteómica mostró indicios claros de cuáles son los mecanismos que se activan cuando el agente controlador afecta al fitopatógeno.

Se encuentran también otros casos relevantes en el empleo de tecnologías proteómicas. Se destaca, por ejemplo, la aplicación de estas metodologías para comprender mejor el modo de acción de los agentes biocontroladores de aplicación en poscosecha sobre la superficie de las frutas. En tal sentido, las levaduras antagonistas son microorganismos utilizados con estos fines, dado que se ha visto su efecto benéfico mediado por diversos factores como la competencia por los nutrientes, la exclusión de nicho y la inducción en el fruto de respuestas de defensa ante los patógenos (Spadaro & Droby, 2016).

Zhang et al. (2017), por ejemplo, estudiaron los efectos de *Yarrowia lipolytica* (levadura antagonista) sobre manzanas para evitar el desarrollo de la enfermedad del moho azul causada por *Penicillium expansum* (Calvo et al., 2007), un importante productor de patulina, que, como se mencionó anteriormente es una micotoxina con actividad citotóxica, genotóxica e inmunosupresora (Puel et al., 2010). Para revelar cuáles mecanismos podrían estar implicados en los beneficios que otorgan levaduras y bacterias, los autores compararon los perfiles proteicos derivados de heridas en manzanas en presencia o ausencia de *Y. lipolytica*, mediante aislamiento de proteínas totales, fraccionamiento por electroforesis bidimensional e identificación posterior con espectroscopía de masas en tándem y el *software* de búsqueda Mascot. Así, mostraron que 12 proteínas se encontraban más expresadas, mientras que otras 23 disminuían su cantidad cuando la levadura estaba presente. De las primeras, destacaron la presencia polipéptidos de defensa y de respuesta al estrés, algunos de ellos previamente descritos en otros sistemas o por métodos diferentes. *Y. lipolytica* estimuló la actividad de polifenoloxidasa, peroxidasa, quitinasa y L-fenilalanina amonio liasa, todas involucradas en el aumento de respuestas de defensa en la manzana. De este modo, entender cuáles son las proteínas que defienden al fruto de *P. expansum* ayudará en la selección de variedades vegetales más resistentes, así como en la selección de nuevos agentes de biocontrol que estimulen vías similares.

Proteómica en el control de insectos

En el control de insectos plaga también se han aplicado las técnicas de investigación en proteómica. Recientemente, un acercamiento desde este campo disciplinar ha sido empleado en el estudio de una cepa altamente proteolítica de *B. bassiana*, entomopatógeno útil para el control de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), considerada la plaga más limitante en el cultivo de tomate (Borgi et al., 2016). En este trabajo, la cepa P2 (un mutante espontáneo de la cepa de *B. bassiana* denominada P1) se caracterizó por mostrar una significativa producción de actividades proteasa y quitinasa, las cuales tienen capacidad degradadora de la cutícula de los insectos, propiedad que la convertía en un mejor agente de biocontrol.

En particular, los autores analizaron las proteínas extracelulares derivadas de cultivos de seis días de las cepas P1 y P2, las cuales fueron recuperadas y separadas por electroforesis bidimensional, para luego, a partir de las señales diferenciales, aislar los polipéptidos, fragmentarlos y analizarlos mediante un nano-HPLC en capilares acoplado a un espectrómetro de masas. Luego, mediante la utilización de diferentes tipos de *software* y análisis estadísticos, concluyeron que ambas cepas producían polipéptidos similares, en su gran mayoría, enzimas hidrolíticas, pero con una abundancia diferencial. Entre ellas, se destacó una proteasa similar a la subtilisina, que evidenció cinco isoformas distintas, de las cuales una se expresaba igual en ambas cepas, mientras que otras dos fueron exclusivas de P2. Los resultados de este trabajo mostraron que el perfil de enzimas extracelulares, especialmente de las proteasas, podría considerarse como una huella dactilar que refleja la patogenicidad de los hongos hacia los insectos y, en consecuencia, este patrón podría ser utilizado para la selección de cepas con potencial en control biológico.

Conclusiones

Como se discutió antes, los beneficios otorgados por las técnicas ómicas para una mejor comprensión de los agentes de control biológico de fitopatógenos y de insectos plaga en la agricultura son incuestionables. Cabe aquí resaltar que, si bien el análisis genómico revela todo el potencial que posee un agente destinado para estos fines —dado que a partir de su aplicación es posible inferir los factores de virulencia que contiene (entre otras características deseables)—, es necesario e imprescindible también abordar las

dimensiones transcriptómicas y proteómicas para evidenciar cuándo y en qué medida esos factores y sus vías asociadas se expresan.

Estas variaciones dependen de regulaciones pre- y pos-transcripcionales y traduccionales que son consecuencia de numerosas variables que aún son difíciles de determinar mediante el análisis de secuencias génicas únicamente. Pequeñas variaciones en los promotores, los UTR (*untranslated regions* o 'regiones no traducidas') y otros subcomponentes genéticos, así como la presencia de genes que expresan moléculas de ARN reguladoras, entre otras múltiples causas, pueden hacer que dos genomas con una gran similitud en sus secuencias expresen fenotipos claramente diferenciales. En función de ello, el análisis de los transcriptos es muy útil, dado que facilita el muestreo tamizado para identificar cuáles genes se estarían expresando ante una situación dada. Sin embargo, dicho análisis no revela información de forma directa sobre las cantidades relativas de las actividades expresadas (téngase presente que principalmente son ejercidas por proteínas) ni sobre sus variaciones producto de sutiles modificaciones sufridas por los polipéptidos y que alteran sus funciones. Es en este punto que los estudios proteómicos revelan un valor único y superior a los anteriores, dado que permiten identificar con gran precisión cuáles son los factores que una entidad expresa ante una situación dada, ya sea el patógeno o su hospedero, y, en consecuencia, las causas de los fenotipos observables, como la virulencia o la capacidad de defensa, respectivamente.

Metabolómica y control biológico

Los microorganismos y los virus que habitan un cierto espacio natural se vinculan de múltiples maneras en complejas redes de interacción. En estos sistemas, cada individuo de una especie dada mostrará un fenoma particular, en virtud de las potencialidades que exprese su genoma y a causa de los vínculos que establezca con los otros miembros presentes de su población (el pangenoma que allí se encuentre), con los representantes de las otras especies (visualizable por el metagenoma) y por las condiciones físicas y químicas del ambiente donde se halle (que modularán en modo significativo cada uno de sus fenotipos). Tal es el grado de complejidad que se requiere de un estudio exhaustivo en distintos niveles informativos, para la comprensión del funcionamiento global de un sistema biológico en estas escalas y, así, poder plantear modelos matemáticos que permitan su comprensión, sostenimiento y proyección.

En tal camino, la metabolómica surge como una capa importante de información biológica que es deseable y necesario explorar, puesto que a partir de ella es posible generar una lectura eficiente de las consecuencias que los estreses ambientales o las interacciones biológicas (incluyendo las relaciones patógeno-hospedero) causan sobre la materia viva. Estos enfoques son centrales para una correcta selección y formulación de agentes de control biológico, ya que otorgan evidencias útiles y permiten identificar moléculas interesantes para la sanidad vegetal.

Metabolómica en el control de fitopatógenos

Las relaciones tripartitas comprendidas por las plantas, sus fitopatógenos y los organismos benéficos han sido muy estudiadas con el fin de promoverlas y usarlas para optimizar el éxito de los sistemas agrícolas. En general, los considerados como "organismos benéficos" son las entidades responsables de reducir en los vegetales los efectos negativos causados por los fitopatógenos y de promover otras respuestas positivas. De todas estas vías funcionales producidas a partir de las interacciones múltiples, se derivan numerosos metabolitos, cuya determinación puede desentrañar información útil para la comprensión global de los ecosistemas, pero, sobre todo, para desarrollar o mejorar bioproductos que les permitan un mayor grado de resiliencia y de productividad a los cultivos. En dicha dirección se han realizado numerosos estudios metabolómicos.

Trichoderma es un género de hongos de amplia distribución mundial, cuyas distintas especies han sido descritas como simbiontes avirulentos de plantas, que funcionan como parásitos y antagonistas de muchos hongos fitopatógenos, y que mejoran, en consecuencia, la sanidad del vegetal con el que interactúan (Vinale et al., 2008). Este hongo produce una gran cantidad

de metabolitos secundarios asociados a las funciones que expresa, lo que incluye antibióticos y otros compuestos con diversas actividades útiles para controlar fitopatógenos. En virtud de ello, los estudios metabolómicos son útiles para seleccionar las mejores cepas de *Trichoderma* spp.

Kang et al. (2011), por ejemplo, evaluaron los perfiles de metabolitos secundarios de 33 cepas pertenecientes a 7 especies de este género, para lo cual utilizaron cromatografía líquida acoplada a espectroscopía de masas (LC-ESI-MS-MS) y métodos estadísticos multivariantes. Así, detectaron diversos compuestos como ácido hetelídico, sorbicilinol, trichodermanona C, ácido giocládico, bisorbicilinol y otras sustancias, algunas de las cuales fueron producidas exclusivamente por ciertas cepas. Lo importante de este estudio es que los autores confrontaron un análisis genético con uno químico derivado del estudio metabolómico, para así inferir la clasificación taxonómica de las cepas estudiadas. De hecho, encontraron que la quimiotaxonomía basada en metabolitos secundarios mostró un mayor poder discriminador que el estudio basado en ITS (*Internal Transcribed Spacers*).

Por otro lado, la exploración metabolómica no solo ayuda en la identificación de cepas destacadas, sino que permite el descubrimiento de nuevos compuestos con gran valor en agricultura y en otras aplicaciones biotecnológicas. Recientemente, fue hallado y caracterizado un estereoisómero del ácido arziánico, denominado ácido isoharziánico, producido por una cepa de *Trichoderma* (Vinale et al., 2014). Esta sustancia demostró inhibir el crecimiento de los fitopatógenos *S. sclerotiorum* y *R. solani*, además de mejorar la germinación de semillas de tomate e inducir resistencia en las plantas. De este modo, la metabolómica muestra su gran utilidad en la optimización de estrategias de control contra fitopatógenos.

Metabolómica en el control de insectos

Los insectos herbívoros también establecen interesantes relaciones multipartitas, que incluyen tanto a la planta que consumen como a los entomopatógenos que los afectan. En este contexto, los insectos pueden inducir respuestas de defensa que actúan contra sus entomopatógenos o, por el contrario, la planta puede defenderse de sus predadores invertebrados promoviendo el desarrollo de microorganismos biocontroladores del insecto, generalmente, a través de la emisión de compuestos orgánicos volátiles (COV) que desencadenan las diferentes respuestas. Para comprender estas interacciones y el diálogo molecular detrás de ellas, es de gran importancia identificar los metabolitos secundarios producidos por cada uno de los protagonistas de estas relaciones, ya que aquellos evidencian las vías empleadas por cada entidad y, a partir de allí, ofrecen una guía para optimizar los procesos deseados y evitar los procesos perjudiciales en los sistemas agrícolas (Beck et al., 2014; Shikano, 2017).

Se ha visto, por ejemplo, que las plantas expresan un perfil de metabolitos diferente según el agente que les provoca un daño. Por ejemplo, el metaboloma de ejemplares de *Solanum lycopersicon* (tomate) se altera de maneras significativamente diferentes cuando la planta es atacada por *Spodoptera littoralis* frente a lo que sucede cuando ocurre un daño mecánico (Zebelo et al., 2012). También existen reportes que muestran que los microbiomas del suelo impactan el metaboloma de la planta y afectan el comportamiento alimentario de los insectos herbívoros. Particularmente, Badri, Zolla, Bakker, Manter, & Vivanco (2013) estudiaron los efectos de diferentes consorcios microbianos presentes en el suelo de plantas de la especie modelo *Arabidopsis thaliana* y su influencia sobre larvas fitófagas de *Trichoplusia ni*. Para su análisis, los compuestos fueron extraídos a partir de diferentes tejidos de las plantas que habían sido expuestas a los distintos tratamientos, para luego ser analizados mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectroscopía de masas. Así, las sustancias fenólicas y los aminoácidos, alcoholes y azúcares mostraron variaciones significativas según el microbioma presente, lo cual estuvo correlacionado, en algunos casos, con la disminución en el consumo de material vegetal por parte de las larvas.

En síntesis, la mirada metabolómica puede ser de gran utilidad para el perfeccionamiento de los sistemas agropecuarios, dado que hace posible identificar numerosos disparadores químicos que podrían utilizarse en forma directa para potenciar la eficacia de agentes de control biológico de insectos plaga.

Conclusiones

De la información que se ha presentado se concluye que ninguna técnica ómica puede otorgar por sí sola toda la información que se requiere para comprender y optimizar un sistema biológico, aunque cada una de ellas ofrece informaciones relevantes que pueden ser directamente aprovechadas sin necesidad de su integración con las otras dimensiones. Por ejemplo, el conocimiento genómico permite hacer un seguimiento preciso de una entidad y, a partir de estudios proteómicos, es posible identificar factores proteicos útiles para diversas actividades humanas. Estos datos se pueden producir en sistemas heterólogos y llegar a ser útiles *per se*. Del mismo modo, la metabolómica no solo es valiosa porque dé indicios firmes sobre las vías funcionales que un organismo vivo se encuentre ejecutando en una condición dada (la cual incluye sus relaciones multipartitas), sino porque también puede ofrecer una colección de compuestos naturales con diferentes actividades (útiles en la agricultura, la biomedicina, etc.). Una vez determinada la composición de estas moléculas, se pueden sintetizar químicamente y explotarse como productos en diferentes campos industriales.

Perspectivas y desafíos conceptuales

En la era posgenómica varios aspectos merecen la atención de los investigadores para la selección y formulación de los microorganismos biocontroladores. Es de esperar que, en un futuro cercano, las tecnologías ómicas continúen con un desarrollo exponencial a un ritmo impredecible y proporcionen evidencias que contribuyan al conocimiento holístico de los sistemas biológicos que se desean intervenir. Este enfoque integrador es particularmente interesante para identificar características específicas y, a veces, inesperadas de los posibles agentes de control biológico y de sus relaciones tróficas con los otros organismos del ecosistema en estudio (Massart et al., 2015). Las investigaciones en esta área aplicarán cada vez más la diversidad de tecnologías ómicas disponibles y otras que serán desarrolladas, dado que son funcionales para proporcionar un mejor conocimiento sobre los modos de acción y sobre aspectos ecológicos de los agentes de control. Sin duda, el conocimiento derivado del uso de estas tecnologías guiará el desarrollo de bioproductos más robustos y de mayor eficiencia que los que existen hoy en el mercado.

Hasta ahora, los enfoques ómicos aplicados a la investigación en control biológico se han llevado a cabo principalmente de manera individual o secuencial, y difícilmente se ha efectuado una integración de estos, en la que yace, tal vez, una sus mayores potencialidades. De hecho, la combinación de la información ómica de manera multiescala podría colaborar en aspectos predictivos sobre la dinámica temporal y espacial de un modelo biológico. Como recientemente proponen varios autores (Barah & Bones, 2014; Yugi et al., 2016), nos aproximamos a un escenario de estudios y proyecciones transómicas, consistente en la integración de la información ómica individual recolectada mediante el empleo de tecnologías de alto rendimiento asociadas a cada dimensión biológica abordable (genómica, epigenómica, transcriptómica, proteómica, interactómica y metabolómica), para comprender, a nivel molecular y con un enfoque integral, el funcionamiento de los sistemas naturales (figura 22.5).

Este análisis integrado brinda la posibilidad de comprender los organismos y los virus, más el conjunto de sus relaciones tróficas, como complejos algoritmos computacionales que pueden ser útiles para revelar aspectos fenómicos trascendentes con enorme impacto en diferentes áreas tecnológicas, incluyendo los agroecosistemas. Un ejemplo en esta dirección se ha logrado con la producción de vinos, dado que una misma variante de vid se desarrolla y produce frutos con una expresión diferencial en función del *terroir*, de las prácticas de cultivo empleadas y de las otras entidades biológicas presentes en el lugar (Fabres et al., 2017). De este modo, la mirada transómica puede ser funcional para el mejor aprovechamiento de un sistema biológico de interés.

Por otra parte, las tecnologías ómicas requieren un mayor desarrollo de conocimientos y habilidades para recolectar información útil y evitar miradas subjetivas en su análisis. Los sesgos pueden introducirse en cualquier etapa del proceso, ya sea en el diseño experimental y preparación de las muestras, ya en los análisis posteriores. Por ejemplo, actualmente no existe un protocolo estándar para el procesamiento

bioinformático de los datos generados por las herramientas ómicas, factor que se convierte en el cuello de botella en la aplicación de estas tecnologías. Las líneas de análisis en bioinformática pueden variar de acuerdo con el *software* elegido y con sus parámetros de aplicación, así como con las bases de datos que se empleen para hacer comparaciones. De esta forma, cuando las estrategias son demasiado astringentes, puede suceder que se deseche información útil; mientras que en líneas de análisis muy relajadas es posible, por el contrario, que se generen falsos positivos.

En estos enfoques, por tanto, es altamente recomendable que se realice un análisis cuidadoso de la información global, para luego proponer metodologías que confirmen individualmente los aspectos seleccionados como útiles para la caracterización del sistema. Por ejemplo, si se detecta en un estudio determinado la presencia de transcriptos, proteínas o metabolitos diferenciales como signo de una interacción en evaluación, cada una de estas moléculas debería ser luego analizada mediante aproximaciones individuales para confirmar las evidencias previas, empleando métodos como la PCR, la RT-PCR o el Western Blot.

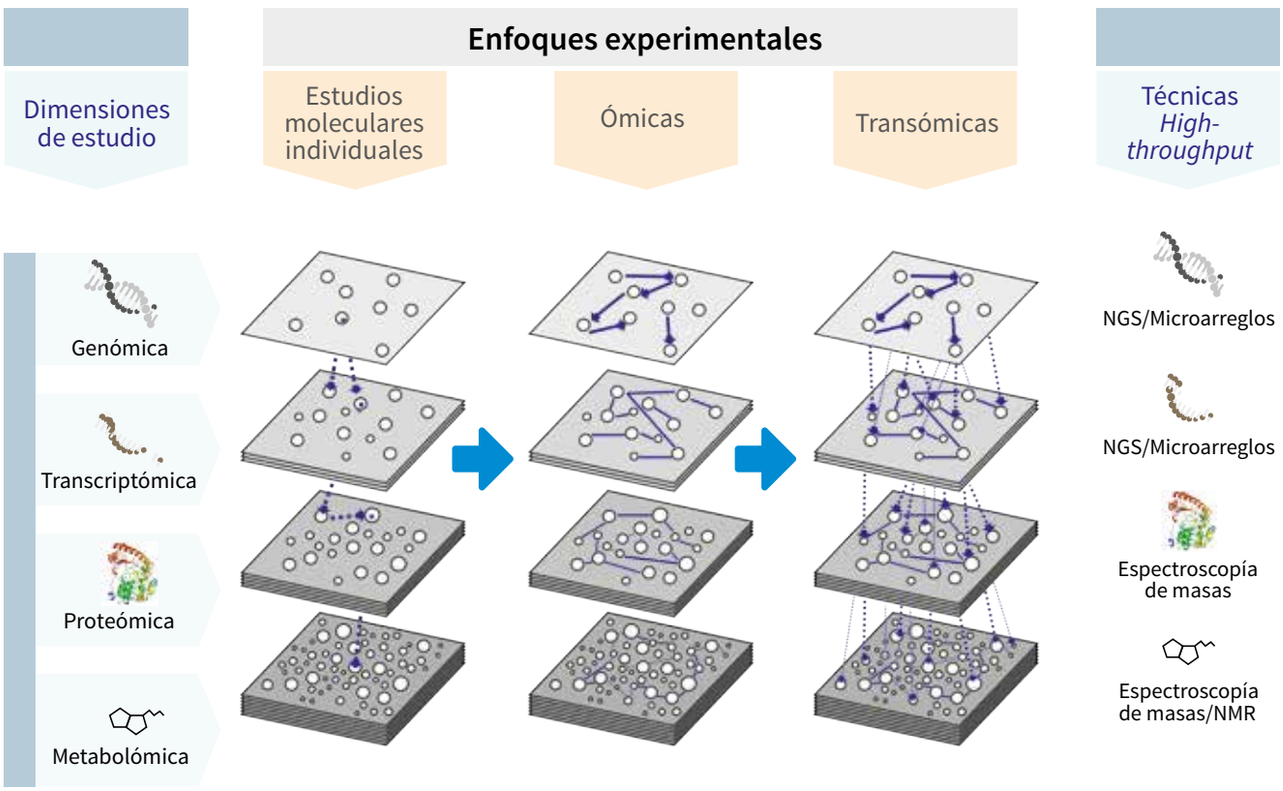


Figura 22.5. Enfoques holísticos en biología. Los fenotipos integrados de un organismo (fenoma) pueden ser abordados mediante su análisis en dimensiones separadas: genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica (aunque existen otras ventanas biológicas informativas, como la epigenómica, la interactómica, etc.). En dichas aproximaciones experimentales se pueden realizar estudios moleculares individuales (como PCR, RT-PCR, secuenciación automática Sanger, Southern/Northern/Western Blot, HPLC, etc.), ómicos (se destacan en la imagen las tecnologías de alto rendimiento más utilizadas hoy en día) y transómicos. Esta última estrategia busca integrar todas las biomoléculas en redes funcionales. Ahora bien, cada una de las dimensiones ómicas está representada por capas, que son múltiples en aquellas ventanas biológicas que son dinámicas por las condiciones de contorno (transcriptómica, proteómica y metabolómica). Las capas contienen círculos blancos que indican las biomoléculas (para el ADN los círculos referencian las secuencias aisladas no concatenadas). Las flechas azules con líneas punteadas representan probables caminos metabólicos en la célula. Las flechas azules con líneas continuas indican los conjuntos de biomoléculas detectadas mediante un enfoque *high-throughput*.

Fuente: Adaptado de Yugi et al. (2016)

También se deberían utilizar herramientas de ingeniería genética, como la interrupción de genes o su sobreexpresión, para apoyar con mayor solidez los conocimientos generados. De esta forma, la complejidad del análisis de la información ómica, más las consideraciones con respecto a las fuentes potenciales de sesgo, hacen necesaria una formación profunda y multidisciplinar del investigador en control biológico o una estrecha colaboración para este por parte de profesionales expertos en áreas emergentes como la bioinformática (Massart et al., 2015).

Otro elemento clave para lograr el éxito de una investigación en esta área con la aplicación de tecnologías ómicas es el diseño de un modelo experimental adecuado que responda satisfactoriamente a las preguntas científicas planteadas. Por ejemplo, muchos estudios transcriptómicos y proteómicos sobre agentes de biocontrol no virales comparan su comportamiento (en condiciones *in vitro*) sujeto a la variación en las fuentes de carbono para su alimentación. En el caso de los virus, también se realizan comparaciones mediante ensayos de exposición de los hospederos (criados en laboratorio) al agente en cuestión (también producido en el laboratorio mediante diferentes estrategias), en entornos distantes a los naturales. En general, estos experimentos son fáciles de llevar a cabo y de controlar en condiciones de laboratorio, pero pueden producir resultados sesgados en comparación con las condiciones de campo, por lo cual pueden resultar poco informativos para mejorar el empleo tecnológico de estos recursos en la agricultura.

Por otra parte, la interpretación biológica de los datos puede ser en apariencia contradictoria. Como ejemplo, Mgbeahuruike et al. (2013) encontraron diferentes evidencias sobre el efecto de las moléculas secretadas por el agente de biocontrol *Phlebiopsis gigantea* sobre el perfil de expresión de genes del patógeno *Heterobasidion annosum* en sentido amplio, que dependen de la etapa de crecimiento del controlador y el momento de interacción. Los genes que codifican proteínas de defensa como las hidrofobinas mostraron una baja expresión, mientras que aquellos relacionados con la percepción de la señal o la tolerancia al estrés fueron altamente expresados. Esto resalta la complejidad subyacente en los mecanismos asociados al control biológico y la importancia de encontrar un diseño experimental adecuado con tiempos de muestreo apropiados.

Como ya se ha mencionado, la secuenciación del genoma de un ACB probablemente sea uno de los primeros pasos en su caracterización. Esta acción puede proporcionar una columna vertebral para apoyar estudios adicionales, cualesquiera que sean las tecnologías y metodologías que se utilicen. Como una aproximación a este objetivo es posible encarar secuenciaciones parciales, lo que incluye segmentos informativos clave para reconocer especies o biotipos, más aquellos asociados al rol biocontrolador deseado, como factores de virulencia y de interacción con los hospederos. Sin embargo, es previsible proyectar que en un futuro cercano se solicite la secuencia genómica completa de un ACB para su registro, dada la disminución de costos y de tiempos asociados al uso de las tecnologías NGS y a la existencia de numerosos procedimientos estandarizados.

Para un mejor desarrollo de las tecnologías ómicas también es importante que se incremente su interacción con las otras metodologías vigentes que, en general, son reconocidas como de "bajo rendimiento" por su rol individual en el estudio de biomoléculas y organismos. Así, es recomendable que el inicio de la caracterización de un ACB con valor potencial para su empleo en campo deba llevarse a cabo mediante la ejecución de metodologías tradicionales, para luego introducir el enfoque ómico (pangenómico, transcriptómico, proteómico, metabolómico o de otra índole). Se recomienda entonces que las primeras hipótesis que se formulen asociadas a la exploración del valor biocontrolador de un ACB estén apoyadas por evidencias microbiológicas, bioquímicas y de imágenes logradas por microscopía.

Con este valioso conocimiento preliminar se puede aplicar un modelo experimental más apropiado para luego planificar el uso de los enfoques ómicos, útiles para aportar un mayor grado de precisión en la caracterización del sistema en estudio, precisión tendiente a su mejor aprovechamiento y potenciación.

En síntesis, es factible visualizar un futuro cercano en el cual las técnicas ómicas serán una parte obligada para el desarrollo de los agentes de control biológico, dado el enorme potencial que la aplicación de estas ha evidenciado en otras áreas científico-tecnológicas y el que están demostrando en la agricultura, como se describió en este capítulo.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Alba Marina Cotes por la invitación a participar en este libro. Pablo Daniel Ghiringhelli y Mariano Nicolás Belaich agradecen a la Universidad Nacional de Quilmes, a Conicet y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de Argentina por financiar sus investigaciones en agrobiotecnología. Gloria Barrera, Stephen Mosher y Alejandro Caro agradecen al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia, a Colciencias y a AGROSAVIA.

Referencias

Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., ... Galle, R. F. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science, 287*(5461), 2185-2195. doi:10.1126/science.287.5461.2185.

Aguilar-Bultet, L., & Falquet, L. (2015). Secuenciación y ensamblaje de novo de genomas bacterianos: una alternativa para el estudio de nuevos patógenos. *Revista de Salud Animal, 37*(2), 125-132.

Ambardar, S., Gupta, R., Trakroo, D., Lal, R., & Vakhlu, J. (2016). High throughput sequencing: An overview of sequencing chemistry. *Indian Journal of Microbiology, 56*(4), 394-404. doi:10.1007/s12088-016-0606-4.

Anderson, J. P., Gleason, C. A., Foley, R. C., Thrall, P. H., Burdon, J. B., & Singh, K. B. (2010). Plants versus pathogens: an evolutionary arms race. *Functional Plant Biology, 37*(6), 499-512. doi:10.1071/FP09304.

Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature, 408*(6814), 796-815. doi:10.1038/35048692.

Badri, D. V., Zolla, G., Bakker, M. G., Manter, D. K., & Vivanco, J. M. (2013). Potential impact of soil microbiomes on the leaf metabolome and on herbivore feeding behavior. *New Phytologist, 198*(1), 264-273. doi:10.1111/nph.12124.

Barah, P., & Bones, A. M. (2014). Multidimensional approaches for studying plant defence against insects: from ecology to omics and synthetic biology. *Journal of Experimental Botany, 66*, 479-493. doi:10.1093/jxb/eru489.

Barrera, G. P., Belaich, M. N., Patarroyo, M. A., Villamizar, L. F., & Ghiringhelli, P. D. (2015). Evidence of recent interspecies horizontal gene transfer regarding nucleopolyhedrovirus infection of *Spodoptera frugiperda*. *BMC Genomics, 16*, 1008. doi:10.1186/s12864-015-2218-5.

Beck, J. J., Smith, L., & Baig, N. (2014). An overview of plant volatile metabolomics, sample treatment and reporting considerations with emphasis on mechanical damage and biological control of weeds. *Phytochemical Analysis, 25*(4), 331-341. doi:10.1002/pca.2486.

Bentley, D. R. (2006). Whole-genome re-sequencing. *Current Opinion in Genetics and Development, 16*(6), 545-552. doi:10.1016/j.gde.2006.10.009.

Bizzini, A., & Greub, G. (2010). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clinical Microbiology and Infection, 16*(11), 1614-1619. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03311.x.

Borgi, I., Dupuy, J. W., Blibech, I., Lapaillerie, D., Lomenech, A. M., Rebai, A., ... Gargouri, A. (2016). Hyper-proteolytic mutant of *Beauveria bassiana*, a new biological control agent against the tomato borer. *Agronomy for Sustainable Development, 36*, 60. doi:10.1007/s13593-016-0394-6.

Brozynska, M., Copetti, D., Furtado, A., Wing, R. A., Crayn, D., Fox, G., ... Henry, R. J. (2017). Sequencing of Australian wild rice genomes reveals ancestral relationships with domesticated rice. *Plant Biotechnology Journal, 15*(6), 765-774. doi:10.1111/pbi.12674.

Brun, S., Madrid, H., Gerrits Van Den Ende, B., Andersen, B., Marinach-Patrice, C., Mazier, D., & De Hoog, G. S. (2013). Multilocus phylogeny and MALDI-TOF analysis of the plant pathogenic species *Alternaria dauci* and relatives. *Fungal biology, 117*(1), 32-40. doi:10.1016/j.funbio.2012.11.003.

Calvo, J., Calvente, V., De Orellano, M. E., Benuzzi, D., & De Tosetti, M. I. S. (2007). Biological control of postharvest spoilage caused by *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. *International Journal of Food Microbiology, 113*(3), 251-257. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.003.

Caspi, R., Altman, T., Dale, J. M., Dreher, K., Fulcher, C. A., Gilham, F., ... Krummenacker, M. (2009). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Research, 40*(Database issue), D742-D753. doi:10.1093/nar/gkr1014.

Chang, H.-X., Lipka, A. E., Domier, L. L., & Hartman, G. L. (2016). Characterization of disease resistance loci in the USDA Soybean Germplasm Collection using Genome-

wide association studies. *Phytopathology*, *106*(10), 1139-1151. doi:10.1094/PHYTO-01-16-0042-FI.

Charlesworth, B., & Charlesworth, D. (2009). Darwin and genetics. *Genetics*, *183*(3), 757-766. doi:10.1534/genetics.109.109991.

Chou, H., Pathmasiri, W., Deese-Spruill, J., Sumner, S., & Buchwalter, D. B. (2017). Metabolomics reveal physiological changes in mayfly larvae (*Neocloeon triangulifer*) at ecological upper thermal limits. *Journal of Insect Physiology*, *101*, 107-112. doi:10.1016/j.jinsphys.2017.07.008.

Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gómez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., ... Mortazavi, A. (2016). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biology*, *17*, 13-19. doi:10.1186/s13059-016-0881-8.

Covington, B. C., McLean, J. A., & Bachmann, B. O. (2016). Comparative mass spectrometry-based metabolomics strategies for the investigation of microbial secondary metabolites. *Natural Product Reports*, *34*(1), 1-19. doi:10.1039/C6NP00048G.

Crick, F. (1970). Central dogma of molecular biology. *Nature*, *227*, 561-563.

Crovadore, J., Xu, S., Chablais, R., Cochard, B., Lukito, D., Calmin, G., & Lefort, F. (2017). Metagenome-Assembled Genome Sequence of *Rhodopseudomonas palustris* Strain ELI 1980, Commercialized as a Biostimulant. *Genome Announcements*, *5*(18), 1-3. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.

Cuartas, P. E., Barrera, G. P., Belaich, M. N., Barreto, E., Ghiringhelli, P. D., & Villamizar, L. F. (2015). The complete sequence of the first *Spodoptera frugiperda* betabaculovirus genome: a natural multiple recombinant virus. *Viruses*, *7*(1), 394-421. doi:10.3390/v7010394.

Douglas, C. J., & Ehlting, J. (2005). *Arabidopsis thaliana* full genome longmer microarrays: A powerful gene discovery tool for agriculture and forestry. *Transgenic Research*, *14*(5), 551-561. doi:10.1007/s11248-005-8926-x.

Duke, K. A., Becker, M. G., Girard, I. J., Millar, J. L., Fernando, W. G. D., Belmonte, M. F., & De Kievit, T. R. (2017). The biocontrol agent *Pseudomonas chlororaphis* PA23 primes *Brassica napus* defenses through distinct gene networks. BMC *Genomics*, *18*, 1-16. doi:10.1186/s12864-017-3848-6.

Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G., ... Turner, S. (2009). Single polymerase molecules. *Science*, *323*(5910), 133-138. doi:10.1126/science.1162986.

Evans, A., Forde, N., O'Gorman, G., Zielak, A., Lonergan, P., & Fair, T. (2008). Use of microarray technology to profile gene expression patterns important for reproduction in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, *43*(s2), 359-367. doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01185.x.

Fabres, P. J., Collins, C., Cavagnaro, T. R., & Rodríguez López, C. M. (2017). A concise review on Multi-Omics data integration for terroir analysis in *Vitis vinifera*. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1065. doi:10.3389/fpls.2017.01065.

Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., ... Merrick, J. M. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, *269*(5223), 496-512. doi:10.1126/science.7542800.

Gao, Q., Jin, K., Ying, S. H., Zhang, Y., Xiao, G., Shang, Y., ... Wang, C. (2011). Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS Genetics*, *7*(1), e1001264. doi:10.1371/journal.pgen.1001264.

Glenn, T. C. (2011). Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources*, *11*(5), 759-769. doi:10.1111/j.1755-0998.2011.03024.x.

Gogna, N., Singh, V. J., Sheeba, V., & Dorai, K. (2015). NMR - based investigation of the *Drosophila melanogaster* metabolome under the influence of daily cycles of light and temperature. *Molecular BioSystems*, *11*(12), 3305-3315. doi:10.1039/c5mb00386e.

Greenbaum, D., Luscombe, N. M., Jansen, R., Qian, J., & Gerstein, M. (2001). Interrelating different types of genomic data, from proteome to secretome:'oming in on function. *Genome Research*, *11*(9), 1463-1468. doi:10.1101/gr.207401.necessary.

Harris, T. D., Buzby, P. R., Babcock, H., Beer, E., Bowers, J., Braslavsky, I., ... Xie, Z. (2008). Single-molecule DNA sequencing of a viral genome. *Science*, *320*(5872), 106-109. doi:10.1126/science.1150427.

Hasin, Y., Seldin, M., Lusis, A., Guo, W., Go, J., Shi, H., ... Landray, M. (2017). Multi-omics approaches to disease. *Genome Biology*, *18*, 83. doi:10.1186/s13059-017-1215-1.

Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., & Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, *158*(Pt1), 17-25. doi:10.1099/mic.0.052274-0.

Hinrichs, J. W. J., Van Blokland, W. T. M., Moons, M. J., Radersma, R. D., Van Loon, J. H. R., De Voijs, C. M. A., ... De Weger, R. A. (2015). Comparison of next-generation sequencing and mutation-specific platforms in clinical practice. *American Journal of Clinical Pathology*, *143*(4), 573-578. doi:10.1309/AJCP40XETVYAMJPY.

Howell, C. R., & Stipanovic, R. D. (1979). Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology*, *69*, 480-482.

Howell, C. R., & Stipanovic, R. D. (1980). Suppression of *Pythium* ultimum-induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. *Phytopathology*, *70*, 712-715.

Hsu, J. C., Chien, T. Y., Hu, C. C., Chen, M. J. M., Wu, W. J., Feng, H. T., ... Chen, C. Y. (2012). Discovery of genes related to insecticide resistance in *Bactrocera dorsalis* by functional genomic analysis of a *De novo* assembled transcriptome. *PLoS One*, *7*(8), doi:10.1371/journal.pone.0040950.

Hu, X., Qin, L., Roberts, D. P., Lakshman, D. K., Gong, Y., Maul, J. E., ... Liao, X. (2017). Characterization of mechanisms underlying degradation of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Aspergillus aculeatus* Asp-4 using a combined qRT-PCR and proteomic approach. *BMC Genomics*, *18*(1), 674. doi:10.1186/s12864-017-4016-8.

Ianiri, G., Idnurm, A., & Castoria, R. (2016). Transcriptomic responses of the basidiomycete yeast *Sporobolomyces* sp. to the mycotoxin patulin. *BMC Genomics*, *17*, 210. doi:10.1186/s12864-016-2550-4.

Kang, D., Kim, J., Choi, J. N., Liu, K.-H., & Lee, C. H. (2011). Chemotaxonomy of *Trichoderma* spp. using mass spectrometry-based metabolite profiling. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *21*(1), 5-13.

Kazemi-Pour, N., Condemine, G., & Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (2004). The secretome of the plant pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Proteomics*, *4*(10), 3177-3186. doi:10.1002/pmic.200300814.

Konstantinidis, K. T., & Tiedje, J. M. (2005). Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(7), 2567-2572. doi:10.1073/pnas.0409727102.

Kraus, J., & Loper, J. E. (1995). Characterization of a genomic region required for production of the antibiotic pyoluteorin by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(3), 849-854.

Lande, N. V., Subba, P., Barua, P., Gayen, D., Keshava Prasad, T. S., Chakraborty, S., & Chakraborty, N. (2017). Dissecting the chloroplast proteome of chickpea (*Cicer arietinum* L.) provides new insights into classical and non-classical functions. *Journal of Proteomics*, *165*, 11-20. doi:10.1016/j.jprot.2017.06.005.

Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., ... FitzHugh, W. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, *409*, 860-921 doi:10.1038/35057062.

Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., ... Law, M. (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2012*, 11. doi:10.1155/2012/251364.

Liu, Y., & Li, X. (2015). Darwin and Mendel today: a comment on "Limits of imagination: the 150th Anniversary of Mendel's Laws, and why Mendel failed to see the importance of his discovery for Darwin's theory of evolution". *Genome*, *59*(1), 75-77. doi:10.1139/gen-2015-0155.

Lorito, M., Woo, S. L., Harman, G. E., & Monte, E. (2010). Translational research on *Trichoderma*: from omics to the field. *Annual Review of Phytopathology*, *48*, 395-417. doi:10.1146/annurev-phyto-073009-114314.

Mahunu, G. K., Zhang, H., Yang, Q., Li, C., & Zheng, X. (2016). Biological control of patulin by antagonistic yeast: A case study and possible model. *Critical Reviews in Microbiology*, *42*(4), 643-655. doi:10.3109/1040841X.2015.1009823.

Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., ... Rothberg, J. M. (2006). Genome sequencing in open microfabricated high density picoliter reactors. *Nature*, *437*(7057), 376-380. doi:10.1038/nature03959.

Marzancola, M. G., Sedighi, A., & Li, P. C. H. (2016). DNA Microarray-Based Diagnostics. En P. C. H. Li, A. Sedighi, & L. Wang, (Eds.), *Microarray Technology: Methods and Applications* (pp. 161-178). Nueva York, EE. UU.: Springer.

Massart, S., Perazzolli, M., Höfte, M., Pertot, I., & Jijakli, M. H. (2015). Impact of the omic technologies for understanding the modes of action of biological control agents against plant pathogens. *BioControl*, *60*(6), 725-746. doi:10.1007/s10526-015-9686-z.

Matarese, F., Sarrocco, S., Gruber, S., Seidl-Seiboth, V., & Vannacci, G. (2012). Biocontrol of Fusarium head blight: Interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*. *Microbiology*, *158*(Pt1), 98-106. doi:10.1099/mic.0.052639-0.

Matskevich, A. A., Quintin, J., & Ferrandon, D. (2011). Pathway Activation Function. *European Journal of Immunology*, *40*(5), 1244-1254. doi:10.1002/eji.200940164.

McKernan, K. J., Peckham, H. E., Costa, G., McLaughlin, S., Tsung, E., Fu, Y., ... Blanchard, A. P. (2009). Sequence and structural variation in a human genome uncovered by short-read, massively parallel ligation. *Genome Research*, *19*(9), 1527-1541. doi:10.1101/gr.091868.109.

Mgbeahuruike, A. C., Kohler, A., & Asiegbu, F. O. (2013). Expression analysis of the impact of culture filtrates from the biocontrol agent, *Phlebiopsis gigantea* on the conifer pathogen, *Heterobasidion annosum* ss transcriptome. *Microbial Ecology*, *66*(3), 669-681. doi:10.1007/s00248-013-0255-7.

Miller, H. I. (2017). Genetic engineering applied to agriculture has a long row to hoe. *GM Crops & Food*, *0*, 1-4. doi:10.1080/21645698.2017.1378840.

Mitter, E. K., De Freitas, J. R., & Germida, J. J. (2017). Bacterial root microbiome of plants growing in oil sands

reclamation covers. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 849. doi:10.3389/fmicb.2017.00849.

Moake, M. M., Padilla-Zakour, O. I., & Worobo, R. W. (2005). Comprehensive review of patulin control methods in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *4*(1), 8-21. doi:10.1111/j.1541-4337.2005.tb00068.x.

Moraes, F., & Góes, A. (2016). A decade of human genome project conclusion: Scientific diffusion about our genome knowledge. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, *44*(3), 215-223. doi:10.1002/bmb.20952.

Moshelion, M., & Altman, A. (2015). Current challenges and future perspectives of plant and agricultural biotechnology. *Trends in Biotechnology*, *33*(6), 337-342. doi:10.1016/j.tibtech.2015.03.001.

Najafabadi, A. S., Naghavi, M. R., Farahmand, H., & Abbasi, A. (2017). Transcriptome and metabolome analysis of *Ferula gummosa* Boiss. to reveal major biosynthetic pathways of galbanum compounds. *Functional & Integrative Genomics*, *17*(6), 1-13. doi:10.1007/s10142-017-0567-7.

Nawaz, M. A., Rehman, H. M., Baloch, F. S., Ijaz, B., Ali, M. A., Khan, I. A., ... Yang, S. H. (2017). Genome and transcriptome-wide analyses of cellulose synthase gene superfamily in soybean. *Journal of Plant Physiology*, *215*, 163-175. doi:10.1016/j.jplph.2017.04.009.

Newman, M. M., Lorenz, N., Hoilett, N., Lee, N. R., Dick, R. P., Liles, M. R., ... Kloepper, J. W. (2016). Changes in rhizosphere bacterial gene expression following glyphosate treatment. *The Science of the Total Environment*, *553*, 32-41. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.02.078.

Oshlack, A., Robinson, M. D., & Young, M. D. (2010). From RNA-seq reads to differential expression results. *Genome Biology*, *11*, 220. doi:10.1186/gb-2010-11-12-220.

Paulsen, I. T., Press, C. M., Ravel, J., Kobayashi, D. Y., Myers, G. S. A., Mavrodi, D. V., ... Madupu, R. (2005). Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nature Biotechnology*, *23*(7), 873. doi:10.1038/nbt1110.

Puel, O., Galtier, P., & Oswald, I. P. (2010). Biosynthesis and toxicological effects of patulin. *Toxins*, *2*(4), 613-631. doi:10.3390/toxins2040613.

Qu, M., An, B., Shen, S., Zhang, M., Shen, X., Duan, X., ... Qu, J. (2016). Qualitative and quantitative characterization of protein biotherapeutics with liquid chromatography mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, *36*(6), 734-754. doi:10.1002/MAS.21500.

Rodríguez-Llorente, I., Caviedes, M. A., Dary, M., Palomares, A. J., Cánovas, F. M., & Peregrín-Álvarez, J. M. (2009). The Symbiosis Interactome: a computational approach reveals novel components, functional interactions and modules in S*inorhizobium meliloti*. *BMC Systems Biology*, *3*, 63. doi:10.1186/1752-0509-3-63.

Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., ... Bustillo, J. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, *475*, 348-352. doi:10.1038/nature10242.

Rozado-Aguirre, Z., Adams, I., Fox, A., Dickinson, M., & Boonham, N. (2017). Complete sequence and genomic annotation of carrot torradovirus 1. *Archives of Virology*, *162*(9), 2815-2819. doi:10.1007/s00705-017-3410-5.

Ryder, L. S., Harris, B. D., Soanes, D. M., Kershaw, M. J., Talbot, N. J., & Thornton, C. R. (2012). Saprotrophic competitiveness and biocontrol fitness of a genetically modified strain of the plant-growth-promoting fungus *Trichoderma hamatum* GD12. *Microbiology*, *158*(Pt 1), 84-97. doi:10.1099/mic.0.051854-0.

Sanger, F., Coulson, A., Friedmann, T., Air, G., Barrell, B., Brown, N., ... Smith, M. (1977a). The nucleotide sequence of bacteriophage φX174DNA. *Nature*, *265*, 687-695. doi:10.1038/265687a0.

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977b). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, *74*(12), 5463-5467. doi:10.1073/pnas.74.12.5463.

Shaw, S., Le Cocq, K., Paszkiewicz, K., Moore, K., Winsbury, R., De Torres Zabala, M., ... Grant, M. R. (2016). Transcriptional reprogramming underpins enhanced plant growth promotion by the biocontrol fungus *Trichoderma hamatum* GD12 during antagonistic interactions with *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. *Molecular Plant Pathology*, *17*(9), 1425-1441. doi:10.1111/mpp.12429.

Shikano, I. (2017). Evolutionary ecology of multitrophic interactions between plants, insect herbivores and entomopathogens. *Journal of Chemical Ecology*, *43*(6), 1-13. doi:10.1007/s10886-017-0850-z.

Spadaro, D., & Droby, S. (2016). Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science and Technology*, *47*, 39-49. doi:10.1016/j.tifs.2015.11.003.

Stoddart, D., Heron, A. J., Mikhailova, E., Maglia, G., & Bayley, H. (2009). Single-nucleotide discrimination in immobilized DNA oligonucleotides with a biological nanopore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(19), 7702-7707. doi:10.1073/pnas.0901054106.

Tan, B. C., Lim, Y. S., & Lau, S.-E. (2017). Proteomics in commercial crops: An overview. *Journal of Proteomics*, *169*, 30185-30189. doi:10.1016/j.jprot.2017.05.018.

Thao, N. P., & Tran, L.-S. (2016). Enhancement of plant productivity in the post-genomics era. *Current Genomics, 17*(4), 295-296. doi:10.2174/1389202917041606071825O7.

The *C. elegans* Sequencing Consortium. (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science, 282*(5396), 2012-2018. doi:10.1126/science.282.5396.2012.

Tyczewska, A., Gracz, J., Kuczyński, J., & Twardowski, T. (2016). Deciphering the soybean molecular stress response via high- throughput approaches. *Acta Biochimica Polonica, 63*(4), 631-643. doi:10.18388/abp.2016_1340.

Udaondo, Z., Duque, E., & Ramos, J.-L. (2017). The pangenome of the genus *Clostridium*. *Environmental Microbiology, 19*(7), 2588-2603. doi:10.1111/1462-2920.13732.

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), 1-21. doi:10.1007/s10526-017-9801-4.

Vidova, V., & Spacil, Z. (2017). A review on mass spectrometry-based quantitative proteomics: Targeted and data independent acquisition. *Analytica Chimica Acta, 964*, 7-23. doi:10.1016/j.aca.2017.01.059.

Vinale, F., Manganiello, G., Nigro, M., Mazzei, P., Piccolo, A., Pascale, A., ... Lanzuise, S. (2014). A novel fungal metabolite with beneficial properties for agricultural applications. *Molecules, 19*(7), 9760-9772. doi:10.3390/molecules19079760.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Barbetti, M. J., Li, H., ... Lorito, M. (2008). A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology, 72*(1-3), 80-86. doi:10.1016/j.pmpp.2008.05.005.

Wang, Y., Yang, P., Cui, F., & Kang, L. (2013). Altered immunity in crowded locust reduced fungal (*Metarhizium anisopliae*) pathogenesis. *PLoS Pathogens, 9*(1), e1003102. doi:10.1371/journal.ppat.1003102.

Wei, N., Bemmels, J. B., & Dick, C. W. (2014). The effects of read length, quality and quantity on microsatellite discovery and primer development: From Illumina to PacBio. *Molecular Ecology Resources, 14*(5), 953-965. doi:10.1111/1755-0998.12245.

Wilson, K., Thomas, M. B., Blanford, S., Doggett, M., Simpson, S. J., & Moore, S. L. (2002). Coping with crowds: density-dependent disease resistance in desert locusts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(8), 5471-5475. doi:10.1073/pnas.082461999.

Williams, H. L., Monge-Monge, K. S., Otvos, I. S., Reardon, R., & Ragenovich, I. (2011). Genotypic variation among Douglas-fir tussock moth nucleopolyhedrovirus (OpNPV) isolates in the western United States. *Journal of Invertebrate Pathology*, *108*(1), 13-21. doi:10.1016/j.jip.2011.06.004.

Wu, J., Cai, G., Tu, J., Li, L., Liu, S., Luo, X., ... Zhou, Y. (2013). Identification of QTLs for resistance to *Sclerotinia* stem rot and BnaC.IGMT5.a as a candidate gene of the major resistant QTL SRC6 in *Brassica napus*. *PLoS One*, *8*(7), e67740. doi:10.1371/journal.pone.0067740.

Xie, W., Chen, C., Yang, Z., Guo, L., Yang, X., Wang, D., ... Zhang, Y. (2017). Genome sequencing of the sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* MED/Q. *GigaScience*, *6*(5), 1-7. doi:10.1093/gigascience/gix018.

Yugi, K., Kubota, H., Hatano, A., & Kuroda, S. (2016). Trans-omics: how to reconstruct biochemical networks across multiple 'omic'layers. *Trends in Biotechnology*, *34*(4), 276-290. doi:10.1016/j.tibtech.2015.12.013.

Zebelo, S. A., Matsui, K., Ozawa, R., & Maffei, M. E. (2012). Plasma membrane potential depolarization and cytosolic calcium flux are early events involved in tomato (*Solanum lycopersicon*) plant-to-plant communication. *Plant Science*, *196*, 93-100. doi:10.1016/j.plantsci.2012.08.006.

Zhang, H., Chen, L., Sun, Y., Zhao, L., Zheng, X., & Yang, Q. (2017). Investigating proteome and transcriptome defense response of apples induced by *Yarrowia lipolytica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, *30*(4), 301-311. doi:10.1094/MPMI-09-16-0189-R.

Zhao, L., Huang, Y., Adeleye, A. S., & Keller, A. A. (2017). Metabolomics reveals $Cu(OH)_2$ nanopesticide activated antioxidative pathways and decreased beneficial antioxidants in spinach leaves. *Environmental Science and Technology*, *51*(17), 10184-10194. doi:10.1021/acs.est.7b02163.

Capítulo 23

Los volátiles microbianos y su potencial en el control biológico de fitopatógenos e insectos

Chapter 23

Microbial volatiles and their potential in the biological control of plant pathogens and insects

Caroline de Clerck,[1] Felipe Borrero-Echeverry[2]

[1] Laboratory of Integrated and Urban Plant Pathology, Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liège, Gembloux, Belgium

[2] Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA)

Contenido

Introducción 992

Los mVOC en el control de patógenos 994

- Los mVOC como estimulantes de plantas 994
- Los mVOC en el control biológico de hongos fitopatógenos 996
- Los mVOC en el control de bacterias 997
- Aplicaciones prácticas de los mVOC en el control de patógenos 998

Los mVOC en el control de insectos 999

- Los mVOC como atrayentes 999
- Los mVOC como repelentes 1000
- Los mVOC como insecticidas 1001
- Los mVOC como inductores de defensas contra insectos en las plantas 1001
- Aplicaciones prácticas de los mVOC en el control de insectos 1001

Perspectivas 1003

Agradecimientos 1005

Referencias 1006

Resumen

La importancia de los microorganismos en las interacciones entre las comunidades y los ecosistemas es un tema de creciente interés por su posible aplicación en el control de patógenos e insectos en los sistemas agropecuarios. El potencial de los compuestos volátiles orgánicos producidos por los microorganismos (mVOC, por su sigla en inglés) para el control de patógenos hasta ahora se empieza a estudiar y a entender. Sin embargo, se ha visto que los mVOC pueden ser promotores de crecimiento e inductores de defensas. Desde comienzos del siglo xx, además, han sido de gran importancia en el control de insectos, ya que su efecto de atracción sobre insectos plaga se ha utilizado para facilitar la eliminación de estos. Su uso como atrayente, de hecho, se ha enfocado en las moscas de la fruta, pero se ha dejado de lado su estudio para el control de otros insectos de importancia económica. Finalmente, se ha evidenciado que los mVOC pueden ser una fuente importante de repelentes o compuestos insecticidas. No obstante, poco se sabe sobre los mecanismos de acción de los volátiles y existen dificultades técnicas que limitan su aplicación en campo. En este capítulo se resume el estado actual del uso de los mVOC en la agricultura, su potencial para futuros desarrollos y los temas que requieren más investigación.

Palabras clave

Atracticidas, atrayentes, inducción de defensas, insecticidas, mVOC, promoción de crecimiento, volátiles

Abstract

The importance of microorganisms in community interactions and ecosystems are of growing interest for the control of pathogens and insect pests in the agricultural sector. The potential of microbial volatile organic compounds (mVOC) for the control of pathogens is an incipient discipline. These compounds have been shown to have various functions such as growth promotion, plant defense induction, and, in some cases, have direct effects on pathogens. However, little is known about the mechanisms behind these effects and their practical application still faces technical difficulties. Microbial volatiles, on the other hand, have been an integral part of insect control due to their function as attractants since the beginning of the xx century. The potential of mVOC as insect repellents and insecticides has only begun to be unraveled. The use of microbial volatiles in insect control has focused mainly on fruit flies with little attention given to other types of insects of agricultural importance. This chapter summarizes the current state of the art in mVOC research in agriculture, their potential for future developments and current research priorities.

Keywords

Attractants, attracticides, growth promotion, induced defenses, insecticides, mVOC, volatiles

Introducción

Los compuestos volátiles orgánicos (VOC, por su sigla en inglés) son compuestos lipofílicos de bajo peso molecular que contienen carbono. Los VOC pueden ser derivados de diferentes rutas metabólicas (Kanchiswamy, Malnoy, & Maffei, 2015b), se evaporan fácilmente y pueden dispersarse desde su punto de origen a través del aire, tierras porosas y líquidos (Effmert, Kalderas, Warnke, & Piechulla, 2012).

Los VOC juegan un papel importante en la comunicación inter- e intraespecífica. La emisión de VOC de las plantas ha recibido la mayor atención por parte de investigadores, ya que son de gran importancia para las interacciones entre estas, los insectos, los patógenos y los simbiontes, tanto en la rizosfera como en la superficie (Baldwin, 2010; Dong, Fu, Watanabe, Su, & Yang, 2016; Dudareva, Klempien, Muhlemann, & Kaplan, 2013; Pickett & Khan, 2016).

Los volátiles producidos por las plantas cumplen varias funciones importantes en la comunicación con otros organismos, como la atracción de polinizadores y dispersores de semillas, la modulación de sus propias defensas y el *priming* de defensas en tejidos y plantas cercanas para estar mejor preparadas ante el ataque de herbívoros y patógenos. Adicionalmente, los VOC emitidos por las plantas cuando estas sufren daños causados por herbívoros pueden ser repelentes hacia otros herbívoros o atrayentes de parasitoides y depredadores (Clavijo McCormick, Unsicker, & Gershenzon, 2012). Algunos VOC también pueden contribuir directamente a las defensas de las plantas a través de su actividad antimicrobiana (Baldwin, 2010) o mediante la moderación del estrés abiótico (Spinelli, Cellini, Marchetti, Nagesh, & Piovene, 2011).

Aunque los microorganismos también emiten VOC como parte de su metabolismo normal, existen menos estudios sobre estos. La mayoría de los volátiles microbianos (mVOC, por sus siglas en inglés) son producto de la oxidación de la glucosa y pueden actuar como intermediarios en su metabolismo tanto primario como secundario (Korpi, Jarnberg, & Pasanen, 2009). Algunos compuestos pueden ser producidos por muchas especies y cepas diferentes de microorganismos, los cuales filogenéticamente pueden ser cercanos o lejanos, mientras que otros compuestos pueden ser producidos por pocas cepas o especies (Garbeva, Hordijk, Gerards, & De Boer, 2014). Sin embargo, la evidencia actual sugiere que no hay mVOC que sean producidos exclusivamente por microbios o por una única cepa o especie (Korpi et al., 2009). Varios factores pueden modificar la cantidad y la composición de los mVOC producidos por un microorganismo: el medio de cultivo, el estado fisiológico de este, la disponibilidad de oxígeno, la humedad, la temperatura y el pH, entre otros (Bailly & Weisskopf, 2012; Garbeva et al., 2014; Insam & Seewald, 2010; Kai et al., 2009; Romoli et al., 2013).

En 2014 se creó una base de datos llamada mVOC, en la que se describen aproximadamente 1.000 volátiles microbianos que provienen de un amplio rango de especies de hongos y bacterias (Lemfack, Nickel, Dunkel, Preissner, & Piechulla, 2014). La existencia de esta base de datos ha permitido observar patrones como estos: los mVOC producidos por hongos son principalmente alcoholes, bencenoides, aldehídos, alquenos, ácidos orgánicos, ésteres y cetonas; mientras que aquellos producidos por bacterias son principalmente alquenos, alcoholes, cetonas, terpenos, bencenoides, pirazinas, ácidos orgánicos y ésteres. El desarrollo de esta base de datos, a futuro, permitirá encontrar más patrones mediante herramientas informáticas cada vez más poderosas y ayudará a elucidar sus posibles funciones.

Las funciones ecológicas de los mVOC en el control de patógenos son poco entendidas y diversas. Se ha sugerido que los VOC pueden jugar un papel en diferentes reacciones metabólicas y fisiológicas de los organismos que los perciben, afectar la percepción de quórum (*quorum sensing*) en comunidades microbianas, funcionar como compuestos de defensa directos contra patógenos o ser utilizados en la comunicación inter- e intraespecífica (Effmert et al., 2012). También se ha observado que pueden tener efectos en la promoción de crecimiento en plantas o en el *priming* de sus defensas (Kanchiswamy, Malnoy, & Maffei, 2015a). Además, los mVOC específicos

pueden servir como marcadores para la detección de especies de hongos o bacterias en el medioambiente (Fiedler, Schutz, & Geh, 2001). En el caso del control de insectos, los mVOC también pueden servir como defensas directas (insecticidas) (Lacey & Neven, 2006; Yee, Lacey, & Bishop, 2009), inductores de defensas en las plantas (Song & Ryu, 2013) o como atrayentes (Becher et al., 2012; Lebreton et al., 2017; Mangan & Thomas, 2014) o repelentes (Becher, Bengtsson, Hansson, & Witzgall, 2010). A continuación, se resumen las diferentes formas en las que se están explorando y utilizando los mVOC para el control de plagas en la agricultura, las dificultades en su estudio y desarrollo y las perspectivas de la inclusión de los volátiles microbianos en estrategias de manejo integrado (figura 23.1).

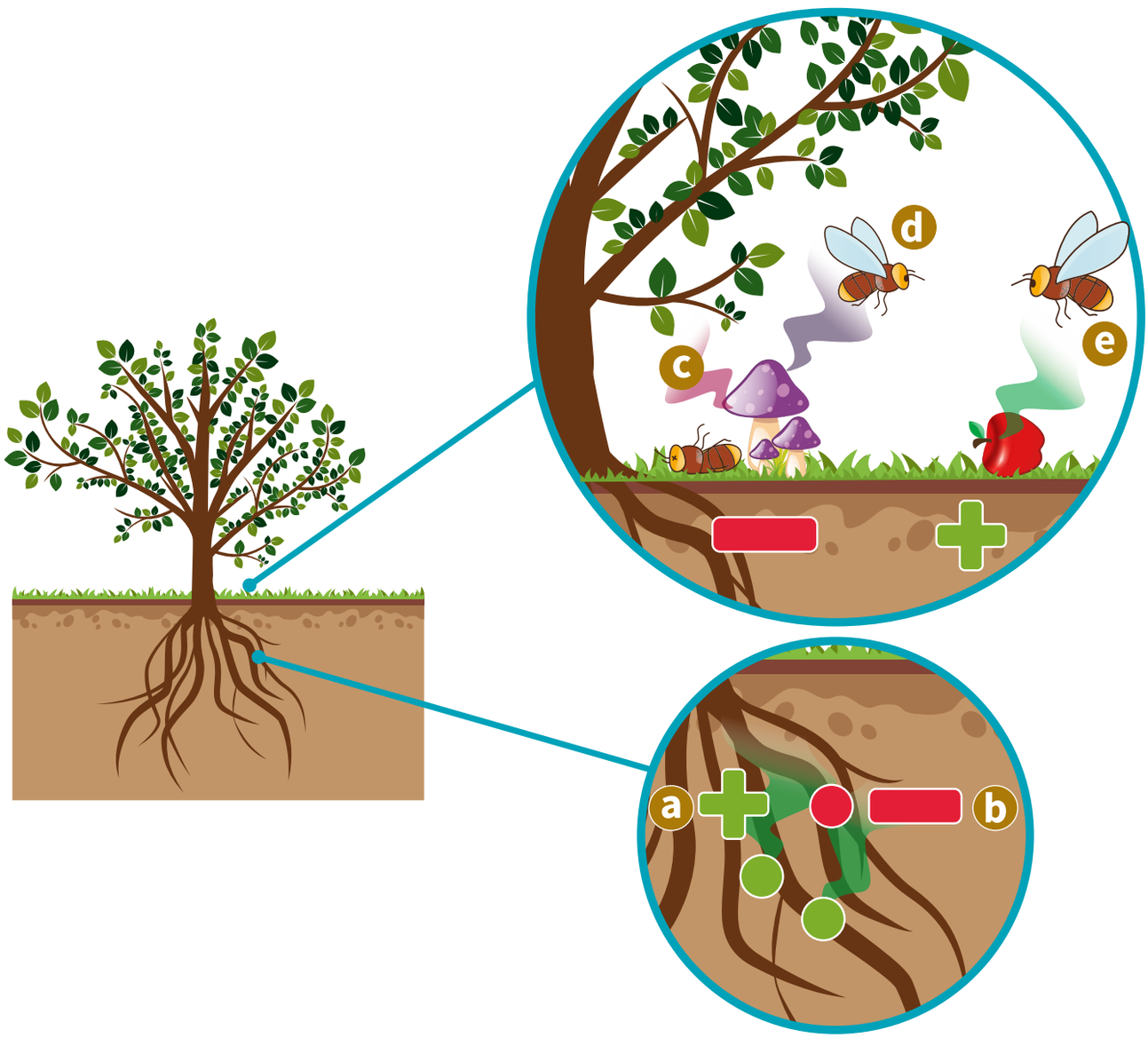


Figura 23.1. Esquema general de la función de los mVOC en el control de patógenos e insectos. a. Efectos directos sobre las plantas (promoción de crecimiento, inducción de defensas o *priming*); b. Efectos directos antimicrobianos sobre patógenos; c. Efectos insecticidas; d. Repelencia; e. Atracción hacia fuentes de alimento o sustratos para la ovoposición.

Fuente: Elaboración propia

Los mVOC en el control de patógenos

La aplicación de mVOC en el control de patógenos ha sido el objetivo de muchos estudios en años recientes, en los cuales también se ha sugerido su uso como biofertilizantes (Bailly & Weisskopf, 2012; Bitas, Kim, Bennett, & Kang, 2013; Kanchiswamy et al., 2015a; Kanchiswamy et al., 2015b; Méndez-Vilas, 2013; Schalchli et al., 2016). El hecho de que muchos mVOC sean solubles en agua, de bajo costo, eficientes en muy bajas concentraciones e inocuos para la salud animal o humana los hace una alternativa promisoria y sostenible para reemplazar los plaguicidas químicos (Farag, Zhang, & Ryu, 2013).

Los mVOC como estimulantes de plantas

Las plantas tienen la capacidad de detectar y de reaccionar ante los volátiles emitidos por hongos o bacterias. La mayoría de la literatura sobre los mVOC producidos por bacterias se refiere a las rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR, por su sigla en inglés). Varios géneros de PGPR emiten volátiles que pueden promover el crecimiento de las plantas, modular la arquitectura de las raíces, inducir las defensas de estas hacia patógenos o promover su tolerancia al estrés biótico (Bailly & Weisskopf, 2012; Gutiérrez-Luna et al., 2010; Liu & Zhang, 2015). En su conjunto, todos estos efectos mejoran la salud de las plantas y les confieren resistencia y resiliencia frente a las enfermedades.

Las PGPR más estudiadas han sido las especies de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* (Asari, Matzen, Petersen, Bejai, & Meijer, 2016; Park, Dutta, Ann, Raaijmakers, & Park, 2015; Tahir et al., 2017). La producción de volátiles promotores del crecimiento parece estar ampliamente distribuida entre las bacterias de la rizosfera (Bailly & Weisskopf, 2012), mientras que la producción de mVOC que llevan a la inducción de defensas parece ser un mecanismo menos frecuente (Farag et al., 2013). Sin embargo, algunos microorganismos pueden producir mVOC con doble función, según el hospedero; por ejemplo, el 2,3-butanediol —el cual es producido por *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* y *Pseudomonas chlororaphis*— tiene efecto en la promoción de crecimiento y en la inducción de defensas en *Arabidopsis thaliana*, mientras que en tabaco solamente induce defensas.

La acetoína, un mVOC producido por *B. subtilis*, induce la resistencia sistémica en *A. thaliana*, lo que lleva a la reducción de la severidad del patógeno *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Rudrappa et al., 2010). Plantas de *Arabidopsis* bajo estrés salino tuvieron mayor producción de biomasa y menor acumulación de Na^+ cuando fueron tratadas con mVOC emitidos por *B. amyloliquefaciens*, en comparación con las del tratamiento control (Liu & Zhang, 2015). Los mecanismos detrás de estos efectos son poco comprendidos y pueden ser diferentes según la planta y los mVOC involucrados. Entre los mecanismos que se han sugerido se encuentran la redistribución de auxinas, la expansión de las células foliares, un incremento en la capacidad fotosintética e incrementos en la absorción de hierro, entre otros (Farag et al., 2013).

De otra parte, no todos los volátiles bacterianos tienen efectos positivos sobre las plantas. Cepas de los géneros *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Serratia* y *Stenotrophomonas* pueden inhibir el crecimiento de las plantas o tener un efecto fitotóxico (Bitas et al., 2013). Bailly y Weisskopf (2012), por ejemplo, con base en estudios de laboratorio sobre plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum*, encontraron que fue mucho más frecuente la inhibición de crecimiento que su promoción a causa de los mVOC de PGPR. Estos efectos varían de acuerdo con el momento en que las plantas son expuestas a los volátiles y el medio de cultivo que se utilice para las PGPR. Se ha sugerido que el amoniaco, el disulfuro de dimetilo (DMDS), el cianuro de hidrógeno y el ácido 3-fenilpropanoico podrían ser los responsables de generar los efectos negativos sobre el crecimiento de las plantas (Blom, Fabbri, Eberl, & Weisskopf, 2011).

Los hongos también producen mVOC que tienen efectos sobre las plantas. Aunque existen menos estudios sobre estos que sobre los volátiles producidos

por bacterias, sus efectos son similares. Varias especies de *Trichoderma* producen volátiles que mejoran la resistencia de las plantas al estrés biótico y abiótico (sequía, cambios de temperatura y salinidad) (Harman, 2011). Hung, Lee y Bennett (2013), por ejemplo, expusieron *A. thaliana* a los mVOC producidos por *Trichoderma viride* y, como consecuencia, las plantas crecieron más altas, florecieron antes y tuvieron más raíces secundarias y clorofila. Los volátiles producidos por *Alternaria alternata*, *Penicillium charlesii* y *Penicillium aurantiogriseum* promovieron el crecimiento y la acumulación de almidón en hojas de varias especies de plantas (Ezquer et al., 2010). Los volátiles de cepas no patógenas de *Fusarium culmorum* no solo promovieron el crecimiento de plantas de lechuga, sino que también las protegieron contra cepas patogénicas del mismo hongo (Minerdi, Bossi, Maffei, Gullino, & Garibaldi, 2011) (figura 23.2).

Foto: Marie Fiers

Figura 23.2. Tipo de bioensayo utilizado para determinar el efecto de los volátiles producidos por el hongo *Fusarium culmorum* sobre el crecimiento de la cebada. Las plántulas nunca entran en contacto directo con el patógeno (centro) o sus secreciones.

Al igual que los mVOC bacterianos, algunos volátiles de hongos pueden tener efectos negativos y, en muchos casos, tóxicos sobre las plantas. Los volátiles producidos por los cuerpos fructíferos de las trufas tienen un efecto negativo en la germinación de las semillas, la elongación de la raíz primaria y el crecimiento foliar en *A. thaliana* (Splivallo, Fischer, Göbel, Feussner, & Karlovsky, 2009). De forma semejante, los volátiles emitidos por los hongos fitopatógenos *Fusarium culmorum* y *Cochliobolus sativus* reducen significativamente el tamaño de las hojas y de las raíces de cebada (Fiers, Lognay, Fauconnier, & Jijakli, 2013).

Los mVOC en el control biológico de hongos fitopatógenos

Existe un gran número de estudios relacionados con el efecto biocontrolador de los volátiles bacterianos sobre los hongos patógenos (Effmert et al., 2012; Kai, Effmert, Berg, & Piechulla, 2009; Kanchiswamy et al., 2015b). Se ha observado, por ejemplo, un efecto negativo de los mVOC producidos por *Serratia* spp. y *Stenotrophomonas* spp. sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* (Kai et al., 2007). Así mismo, los volátiles producidos por cepas de *B. pumilus* y *B. subtilis*, aislados de la rizosfera de pepino, inhibieron el crecimiento de un rango amplio de patógenos de suelo (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria brassicae*, *Alternaria solani* y *Fusarium culmorum*, entre otros) (Liu, Mu, Zhu, Du, & Liu, 2008). Por su parte, el dimetil disulfuro (DMDS) producido por *Bacillus cereus* protegió de forma significativa al tabaco contra

Foto: Marie Fiers

Figura 23.3. Bioensayo en caja de Petri subdividida para observar el efecto de mVOC sobre el crecimiento de *Cochliobolus sativus*. En la cámara de la izquierda se cultiva el hongo y en la derecha se pone un trozo de papel de filtro con el volátil o mezcla de volátiles que se quiere evaluar. El único contacto entre el hongo y el tratamiento es por vía aérea.

B. cinerea y al maíz contra *Cochliobolus heterostrophus*, sin embargo, es importante mencionar que el DMDS también tiene efectos fitotóxicos (Huang et al., 2012) (figura 23.3).

De otra parte, a los volátiles producidos por bacterias también se les ha encontrado actividades fungicidas o fungistáticas, principalmente, sobre especies de *Alternaria*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia* y *Verticillium*. Así, los géneros que han demostrado el mayor potencial para inhibir hongos fitopatógenos son *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces* (Kai et al., 2009; Méndez-Vilas, 2013). Este efecto puede deberse a la inhibición de la germinación de las esporas, de la formación de cuerpos fructíferos o del crecimiento micelial, así como a la reducción de la esporulación del patógeno (Kai et al., 2009).

Los volátiles producidos por una cepa bacteriana específica no causan el mismo efecto o grado de inhibición sobre todos los hongos (Kai et al., 2009). Los mVOC de *B. subtilis* han mostrado una mayor inhibición del crecimiento micelial de *S. sclerotiorum*, *R. solani*, *B. cinerea* o *Pythium afertile* que de *Pythium ultimum* o de especies de *Alternaria* y *Fusarium* (Chaurasia et al., 2005; Fiddaman & Rossall, 1994). Inclusive VOC de cepas bacterianas cercanas muestran efectos diferenciales sobre un mismo hongo o sobre un oomiceto. Ann (2012) mostró que solo una de seis cepas de *Bacillus* inhibe el crecimiento de *Phytophthora capsici*, mientras que *Colletotrichum* y *Fusarium* fueron inhibidos por seis cepas. Méndez-Vilas (2013) sugiere que *S. sclerotiorum*, *B. cinerea*, *Alternaria* sp. y los oomicetos son más sensibles a los mVOC bacterianos, mientras que las diferentes especies de *Fusarium* son más resistentes. La contradicción entre estos resultados resalta las diferencias entre cepas y condiciones de crecimiento, y evidencia la necesidad de llevar a cabo estudios sobre sistemas específicos.

Los hongos también producen metabolitos con propiedades antifúngicas. *Oxyporus latemarginatus* EF069 produce volátiles (principalmente el 5-pentil-2-furaldehído) que inhiben el crecimiento de *A. alternata*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum*, *B. cinerea* y *R. solani* (Lee et al., 2009). Los mVOC emitidos por el hongo endófito *Muscodor albus* inhiben el crecimiento y la germinación de esporas de *Tilletia* en arroz (Goates & Mercier, 2009). Otras especies del género *Muscodor* también han demostrado un alto potencial para el manejo de patógenos en pre- y poscosecha (Alpha, Campos, Jacobs-Wagner, & Strobel, 2015; Hutchings, Alpha-Cobb, Hiller, Berro, & Strobel, 2017). Los mVOC de *Muscodor* inclusive se han propuesto como potenciales reemplazos del bromuro de metilo en el control de fitopatógenos del suelo. Sin embargo, los volátiles de los hongos también pueden inhibir su propio crecimiento, como se observa en *M. albus* y *Colletotrichum fragariae* (Miyagawa, Inoue, Yamanaka, Tsurushima, & Ueno, 2000). De igual manera, el 1-octeno-3-ol, que es un compuesto común en los mVOC producidos por los hongos, autorregula la germinación de *Penicillium paneum* (Chitarra, Abee, Rombouts, Posthumus, & Dijksterhuis, 2004). Este compuesto también actúa de forma indirecta sobre *B. cinerea* en *A. thaliana* al inducir la activación de las defensas asociadas por la vía del ácido jasmónico (Kishimoto, Matsui, Ozawa, & Takabayashi, 2007).

En la actualidad se desconocen los mecanismos de acción de los volátiles con actividad antifúngica. Se ha sugerido que estos pueden causar daños en el ADN (Mitchell, Strobel, Moore, Robison, & Sears, 2010) o alterar la expresión de las enzimas asociadas con la morfogénesis, lo cual afecta el crecimiento de los hongos (Wheatley, 2002). Otra hipótesis es que alteran las propiedades de la membrana celular, lo que genera cambios en la permeabilidad y mayor estrés oxidativo (Effmert et al., 2012).

Los mVOC en el control de bacterias

Existen pocos estudios sobre los efectos antibacterianos de los mVOC. Moléculas como el DMDS, con una actividad antifúngica y fitotóxica fuerte, no muestran actividad antibacterial, más aún, se ha visto que pueden estimular el crecimiento de algunas bacterias (Garbeva et al., 2014). Aunque algunas lactonas, como las gamma-butirolactonas que son producidas por bacterias marinas, tienen actividad contra un amplio rango de bacterias grampositivas y gramnegativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y

Micrococcus luteus, entre otras) (Schulz et al., 2010). Los hongos del género *Muscodor* también han sido ampliamente estudiados en este sentido (Hutchings et al., 2017; Mitchell et al., 2010; Strobel, 2006). *Muscodor albus*, por ejemplo, emite volátiles que inhiben el crecimiento de un rango amplio de bacterias patógenas de plantas y de humanos. *Muscodor crispans* produce una mezcla de volátiles que muestra una actividad fuerte contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Mitchell et al., 2010).

Similar al caso de los hongos, el mecanismo por el cual los volátiles afectan a las bacterias tampoco ha sido bien estudiado. Se ha sugerido que la hidrofobicidad de estos compuestos incrementa la permeabilidad de la membrana y puede llegar a romperla (Trombetta et al., 2005). Otra posibilidad es que los volátiles estén interfiriendo con el *quorum sensing* de las bacterias y estén alterando la regulación de sus poblaciones (Ryan & Dow, 2008).

Aplicaciones prácticas de los mVOC en el control de patógenos

Pocos estudios han verificado el efecto de los mVOC *in vivo* y aún menos su efecto en condiciones de campo. En la mayoría de los estudios *in vivo*, los microorganismos son cultivados en medios artificiales y luego transferidos al suelo. Por ser artificiales, estas condiciones de crecimiento afectan la mezcla de volátiles y de otros metabolitos que se producen, puesto que las condiciones nutricionales y el efecto de la comunidad microbiana del suelo modulan la producción de compuestos. La aplicación de estos compuestos en el suelo también dificulta determinar si el efecto que se está evidenciando se debe a los volátiles o a otros factores bióticos o abióticos. Esta dificultad ha sido evidenciada en los trabajos de Berrada, Benkhemmar, Swings, Bendaou y Amar (2012) y de Fernando, Ramarathnam, Krishnamoorthy y Savchuk (2005), quienes al utilizar cepas productoras de volátiles no han podido demostrar que el efecto de *Bacillus* y de *Pseudomonas* contra *B. cinerea* y *S. sclerotiorum* se haya debido a los mVOC producidos y no a otros mecanismos de acción.

Sin embargo, varios estudios han logrado demostrar el efecto directo de los volátiles mediante experimentos de laboratorio en los cuales los volátiles de biocontroladores cultivados en cámaras selladas se aplican sobre patógenos cultivados en cajas Petri y en plantas infectadas. En estas condiciones experimentales, se observó que los volátiles de *Streptomyces platensis* inhibieron el crecimiento de varios patógenos en plantas cultivadas en suelo (Wan, Li, Zhang, Jiang, & Huang, 2008).

Otros estudios han utilizado semillas autoclavadas y medios mínimos para el crecimiento de las bacterias y de los hongos productores de VOC (Cortés-Barco, Goodwin, & Hsiang, 2010; Cortés-Barco, Hsiang, & Goodwin, 2010; Li et al., 2012). Con tales métodos, Li et al. (2012) demostraron el efecto inhibitorio de los volátiles de *Streptomyces globisporus* sobre *B. cinerea*.

En condiciones de poscosecha, la fumigación con *M. albus* cultivado sobre granos autoclavados logró controlar en su totalidad *Penicillium expansum* y *B. cinerea* en manzanas y duraznos (Mercier & Jiménez, 2004).

Volátiles individuales han sido evaluados en invernadero, y se observó, por ejemplo, que en plantas de tabaco en suelo regado con DMDS hubo protección contra *B. cinerea*. Sin embargo, no ha sido posible determinar si la protección se dio por el efecto directo de los volátiles sobre el patógeno o por el DMDS al elicitar las respuestas de defensa de las plantas a través de la rizosfera (Huang et al., 2012). En condiciones de campo se ha observado que la inmersión de raíces de pimentón y de semillas de cohombro en soluciones de volátiles bacterianos indujo resistencia y *priming* durante cuatro años consecutivos (Song & Ryu, 2013).

Estos ejemplos demuestran el potencial del uso de volátiles microbianos en el control de enfermedades en invernadero y en campo, sin embargo, aún no se están utilizando en la agricultura.

Todavía falta mucha información relacionada con el modo de acción que ejercen sobre plantas y patógenos, y faltan mayores desarrollos en los métodos de aplicación. Adicionalmente, se requieren más estudios para validar los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* en condiciones de campo.

Los mVOC en el control de insectos

En contraposición al uso de los volátiles microbianos para el control de patógenos, los mVOC han tenido un mayor desarrollo y aplicación en el control de insectos. Muchos insectos plaga son atraídos hacia los volátiles producidos por la fermentación y descomposición de sustratos que son fuente de alimentación para los adultos o que les sirven como sitios de ovoposición y de desarrollo larval (Becher et al., 2012; Christenson & Foote, 1960; El-Sayed, Heppelthwaite, Manning, Gibb, & Suckling, 2005; Honda, Ishiwatari, & Matsumoto, 1988). Los mVOC también pueden ser reconocidos por los insectos como indicadores de hábitats nocivos y funcionar como repelentes (Stensmyr et al., 2012).

Aunque ha sido menos investigado, los mVOC también pueden funcionar directamente como insecticidas (Lacey & Neven, 2006; Yee et al., 2009) o inducir las defensas de las plantas contra los insectos (Song & Ryu, 2013).

Los mVOC como atrayentes

Los volátiles microbianos se han utilizado de forma indirecta para el control de insectos, principalmente en moscas (Diptera) y en algunas polillas (Lepidoptera) desde comienzos del siglo xx. Desde 1905 se había determinado el potencial de las trampas con azúcares fermentados para el control de moscas de la fruta (Tephritidae) (Isaac, 1905). En la primera mitad del siglo, las trampas de fermentación recibieron mucha atención y se comenzaron a utilizar para un mayor número de especies de insectos (Eyer & Medler, 1940; Peterson, 1925; Yetter & Steiner, 1931); inclusive, se había comenzado a evaluar la atractividad de compuestos derivados de la fermentación como el ácido acético, el etanol y el CO_2 (Eyer, Medler, & Linton, 1937; Frost, 1937; Peterson, 1925).

Posteriormente a estos estudios iniciales, se comenzó a incluir levadura en las trampas, con el fin de incrementar la tasa de fermentación (Baker, 1944; Starr & Shaw, 1944) y evitar que las comunidades nativas de microbios redujeran la atractividad de los cebos (Green, Beroza, & Hall, 1960).

En 1939, McPhail, con base en el olor a amoniaco de las trampas de fermentación de *Anastrepha striata*, comenzó a utilizar mezclas de azúcares con proteína hidrolizada, lo cual se volvió un estándar en este tipo de trampas (Boyce & Bartlett, 1941; Dean, 1941; McPhail, 1939).

A partir de estas trampas iniciales de proteína hidrolizada, se desarrollaron las trampas de amonio. El amoniaco, el sulfato de amonio, el fosfato de amonio y el carbonato de amonio incrementan la captura de diferentes especies y géneros de moscas de la fruta, entre ellos, *Rhagoletis pomonella*, *Rhagoletis cingulata*, *Zonosemata electa*, *Ceratitis capitata*, *Bactrocera tryoni* y *Silba adipata* (Frick, 1952; Gow, 1954; Hodson, 1943; Raz, 1997). Estas trampas de proteína hidrolizada con diferentes sales de amonio han llevado al desarrollo de varias formulaciones comerciales como BioLure con acetato de amonio —Suterra LLC (Oregón, EE. UU.)—, AgriSense Lure con bicarbonato de amonio —Suterra LLC (Oregón, EE. UU.)— y cebos con carbonato de amonio —Great Lakes IPM (Michigan, EE. UU.) e ISCA Technologies (California, EE. UU.)—.

La segunda mitad del siglo xx se enfocó en determinar cuáles eran los compuestos químicos específicos de la fermentación de los cebos de proteína hidrolizada responsables de la atracción de los insectos. Los análisis de los mVOC producidos por estos cebos habrían de caracterizar en un futuro docenas de compuestos producidos: los estudios confirmaron que el amoniaco y sus sales (Bateman & Morton, 1981; Mazor, Gothilf, & Galun, 1987) y el ácido acético eran los causantes del efecto atrayente (Buttery, Ling, Teranishi, & Mon, 1983; Keiser et al., 1976). Estudios subsecuentes determinaron que la putrescina mezclada con amonio era tan eficiente como las trampas de proteína hidrolizada (Heath, Epsky, Midgarden, & Katsoyannos, 1995; Robacker & Warfield, 1993), lo cual llevó al desarrollo de los cebos comerciales 2C BioLure (Suterra LLC) (Epsky, Heath, Guzmán, & Meyer, 1995). Luego, Heath, Epsky, Dueben, Rizzo y Jerónimo (1997) determinaron que la adición de trimetilamina tenía un efecto sinérgico con las trampas 2C BioLure, lo cual llevó al desarrollo de los cebos 3C BioLure.

Aunque las trampas de mVOC sintéticas han demostrado ser efectivas, la necesidad de bajar sus costos ha llevado a que los cebos de proteína hidrolizada sigan siendo comunes. De hecho, estos últimos se pueden desarrollar a partir de productos y residuos disponibles localmente, como caseína, soya, maíz, fríjol u otras fuentes de proteína, con la adición de levaduras comercialmente disponibles o con fuentes de azúcar —como la caña de azúcar o el vino— para controlar diferentes insectos como picudos de la palma o moscas varias (Castrejón-Gómez, Aluja, Arzuffi, & Villa, 2004; Mangan and Thomas, 2014). Otras fuentes de proteína como las heces de la producción avícola (Hendrichs & Hendrichs, 1990; Robacker, García, & Bartelt, 2000) han sido evaluadas con éxito (Piñero, Aluja, Vázquez, Equihua, & Varón, 2003). Aunque este tipo de atrayente puede ser una opción viable para los agricultores de bajos ingresos, la gran variedad de fuentes de azúcar y de proteína que se utiliza impide que estos cebos se puedan comparar para determinar su efectividad. Adicionalmente, dado que muchas veces son de producción casera o rudimentaria, su efectividad es variable.

Otras áreas de interés en el estudio de los mVOC como atrayentes de insectos son la sanidad pecuaria y la salud humana. Los insectos hematófagos utilizan los volátiles producidos por sus hospederos para localizarlos. Estos volátiles normalmente provienen de la respiración (como el CO_2 y el amoniaco) (Barrozo & Lazzari, 2006; Dekker, Geier, & Carde, 2005; Pinto, Campbell-Lendrum, Lozovei, Teodoro, & Davies, 2001), los olores corporales (Allan, Bernier, & Kline, 2006; Majeed, Hill, Birgersson, & Ignell, 2016) y la orina o las heces de los animales (Krcmar, Mikuska, & Merdic, 2006; Tangtrakulwanich et al., 2015).

Muchos de los compuestos que se han identificado como atrayentes de los insectos hematófagos tienen un origen microbiano. Compuestos como el amoniaco, el 1-octen-3-ol, la acetona, el fenol, el m-cresol, el p-cresol y el dimetil trisulfito, todos provienen de la actividad microbiana asociada a los mamíferos. Las moscas de establo (*Stomoxys calcitrans*) y de cuernos (*Haematobia irritans*) son atraídas hacia los olores provenientes de la fermentación de las heces (fenol, m-cresol y p-cresol) y del aliento de los mamíferos (CO_2, acetona y 1-octen-3-ol) (Birkett et al., 2004; Jeanbourquin & Guerin, 2007a; Jeanbourquin & Guerin, 2007b; Schofield & Brady, 1997; Tangtrakulwanich et al., 2015). Los tábanos y las moscas tse-tse son atraídas hacia los compuestos fenólicos que producen las bacterias a partir de la orina de los rumiantes (Baldacchino et al., 2013; Krcmar et al., 2006; Madubunyi, Hassanali, Ouma, Nyarango, & Kabii, 1996). El ácido láctico, el ácido tetradecanoico y el amoniaco, olores comunes del cuerpo de los mamíferos son producidos por las comunidades bacterianas de la piel y se ha visto que son atrayentes de moquitos (Mukabana et al., 2012). Estos volátiles presentan oportunidades interesantes para desarrollar estrategias de control de ectoparásitos y de vectores de enfermedades de forma sostenible y con grandes beneficios para la salud y el bienestar humano y animal.

Los mVOC como repelentes

El uso de los mVOC como repelentes de insectos ha sido menos estudiado que los repelentes botánicos. A pesar de esto, existen investigaciones en las que se han encontrado volátiles producidos por microorganismos que se pueden utilizar en el control de insectos. El hongo endófito *Muscodor vitigenus* produce naftalina bajo ciertas condiciones de cultivo. La naftalina producida por el hongo repele a la mosca *Cephus cinctus* de forma similar a la naftalina comercial y ya ha sido patentada con este fin (Daisy et al., 2002). Otro compuesto, la geosmina, es un volátil comúnmente producido por bacterias del género *Streptomyces* y tiene un olor característico a tierra húmeda. Se ha observado que *Drosophila melanogaster* es repelida por este compuesto, ya que sobre una fruta en descomposición este compuesto sugiere la presencia de microorganismos antagonistas de las levaduras y, por tanto, un hábitat desfavorable (Becher et al., 2012; Stensmyr et al., 2012). También se ha observado que los insectos son repelidos por los olores producidos por los hongos entomopatógenos. Las termitas y las mariquitas (*Coccinella septempunctata*) evitan los mVOC producidos por *Beauveria bassiana* (Hussain, Tian, He, Bland, & Gu, 2010; Yanagawa et al., 2011). El olor de cadáveres de larvas y babosas infectados con nematodos repele al cucarrón depredador *Pterostichus melanarius* (Foltan & Puza, 2009). Aunque hay estudios preliminares del uso de mVOC repelentes,

hace falta un gran esfuerzo en la bioprospección de estos y su desarrollo para que logren ser utilizados en el control de insectos.

Los mVOC como insecticidas

Pocos estudios han investigado el uso de volátiles microbianos como insecticidas. No obstante, los volátiles del endófito *Muscodor albus*, por ejemplo, que presentan actividad antimicrobiana, también tienen actividad insecticida: causaron una mortalidad mayor al 70 % de larvas neonatas de *Phthorimaea operculella* y mayor al 90 % en adultos (Lacey & Neven, 2006). En *Cydia pomonella*, la fumigación en condiciones simuladas de almacenamiento con volátiles de *M. albus* generó una mortalidad del 81 % en adultos, 86 % en larvas de primer instar, 71 % en manzanas infestadas y 100 % en pupas (Lacey, Horton, Jones, Headrick, & Neven, 2009). Asimismo, los volátiles de esta especie redujeron la emergencia de adultos de *Rhagoletis indifferens* hasta en un 80 % (Yee et al., 2009). Estos estudios demuestran el potencial de los mVOC como insecticidas, principalmente para controlar plagas en condiciones de almacenamiento, pero, es necesario llevar a cabo más estudios sobre su método de aplicación antes de que puedan ser ampliamente utilizados.

Los mVOC como inductores de defensas contra insectos en las plantas

La mayoría de los estudios sobre el efecto de la inducción de defensas contra insectos se ha basado en la producción de volátiles que atraen depredadores y parasitoides cuando una planta sufre los efectos de la herbivoría (Dicke, Van Poecke, & De Boer, 2003; Joo et al., 2017; Xiao et al., 2012). Sin embargo, hay un creciente número de estudios sobre la inducción de defensas contra insectos plaga en las plantas expuestas a mVOC (Jaber & Vidal, 2010; Martini, Pelz-Stelinski, & Stelinski, 2014; Shi et al., 2016).

Los patógenos activan las defensas de la ruta biosintética del ácido salicílico, que conlleva defensas principalmente contra los patógenos necrófagos y los insectos chupadores. No obstante, los estudios actuales no permiten identificar si estos efectos se dan a causa de los mVOC producidos o por el efecto directo de las comunidades microbianas sobre las plantas. El estudio de Song y Ryu (2013) demuestra que los mVOC 3-pentanol y 2-butanona inducen la resistencia contra el patógeno *Pseudomonas syringae* y contra el áfido *Myzus persicae*, respectivamente, e incrementan las poblaciones del depredador *Coccinella septempunctata*, mediante cambios en la regulación del gen CsLOX1. Aunque ambos compuestos son altamente volátiles, en dicho estudio los compuestos fueron aplicados al suelo, lo cual no asegura que el efecto observado se deba al contacto directo de estos compuestos con las raíces.

Aplicaciones prácticas de los mVOC en el control de insectos

Los volátiles microbianos, a través de trampas de fermentación y de proteínas hidrolizadas o sintéticas, han tenido una gran aplicación a nivel mundial, en especial, para el control de moscas. Una de las aplicaciones de mayor uso e importancia ha sido la detección temprana de especies invasivas y el consecuente establecimiento de zonas de cuarentena dentro de los programas fitosanitarios nacionales.

Actualmente existen trampas para la mayoría de las especies invasivas de moscas de la fruta. Dado que el rango efectivo de las trampas suele ser de hasta 50 m (Epsky et al., 2010), es necesario utilizar una gran cantidad de estas en los puertos de entrada y cruces fronterizos para detectar poblaciones invasivas. Normalmente, por limitantes económicos no es posible utilizar esta densidad de trampas, por lo cual se suelen ubicar a una distancia de entre 100 m y 400 m una de la otra (Dowell, Siddiqui, Meyer, & Spaugy, 1999; Ha, Larson, Harvey, Fisher, & Malcolm, 2010; Meats, Clift, & Perepelicia, 2002; Meats, Clift, & Robson, 2003). Una de las grandes ventajas del uso de cebos con base en volátiles microbianos, en el caso de las moscas de la fruta, es que la mayoría de las especies se pueden atrapar con máximo cuatro cebos diferentes, en vez de un cebo para cada especie. Como estos cebos se pueden combinar en las mismas trampas, se reducen

los costos y se incrementa la eficiencia de los programas de manejo (Shelly, Nishimoto, & Kurashima, 2012; Vargas et al., 2012).

Otro uso común de los mVOC para el control de insectos es la utilización de la estrategia de atracticidas (*lure and kill, attract and kill, male annihilation, attracticide*) y de capturas masivas. A diferencia de las trampas en las que los insectos son retenidos físicamente, los atracticidas son una mezcla de atrayentes con compuestos insecticidas para remover a los individuos de la población efectiva o, mezclados con esterilizantes, para evitar la población potencial (Jones, 1998). Es necesario resaltar que este tipo de control no sirve para monitoreo en programas de MIP, sino para programas de control y erradicación. El diseño de los atracticidas depende en gran medida de la biología del insecto que se quiere controlar. En efecto, para el control de la mosca de la manzana (*Rhagoletis pomonella*), se desarrollaron esferas rojas recubiertas con azúcar, plaguicidas y atrayentes (Prokopy, 1975; Zhang et al., 1999) —para más ejemplos del uso de atracticidas, véase Piñero et al. (2014)—.

Los primeros reportes se refieren al uso de atracticidas de forma masiva para el control de *Bactrocera dorsalis* en California, donde se crearon atracticidas utilizando metil eugenol con insecticidas organofosforados (Christenson, 1963). Desde entonces, se han utilizado en muchos sistemas productivos; por ejemplo, está reportado su uso en Estados Unidos en programas de erradicación y control de moscas de la fruta de todos los géneros de importancia económica: *Bactrocera*, *Rhagoletis*, *Ceratitis*, *Anastrepha* y *Toxotrypana* (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/International Atomic Energy Agency [FAO/IAEA], 2009; Quilici et al., 2007). En el programa de MIP para moscas de la fruta en Hawái se utilizaron trampas de una vía con atrayentes, las cuales, aunque no utilizan insecticidas —factor que reduce su impacto ecológico—, aseguran la muerte de las moscas mediante su imposibilidad de escape (Quesada et al., 2011; Vargas et al., 2007; Vargas et al., 2000). El uso de mVOC en atracticidas ha mostrado ser efectivo en el programa de manejo regional Moscamed de *C. capitata* (Estados Unidos, México y Guatemala) (Martínez & López, 2010; Schunemann, 1984). Uno de los insectos más amenazantes en la producción de frutas en las zonas templadas, la *Drosophila* de alas "punteadas" (*Drosophila suzukii*), una especie sumamente invasiva, es controlada en la actualidad casi exclusivamente mediante el uso de trampas de fermentación con insecticidas (Cha et al., 2017; Hamby & Becher, 2016; Kleiber et al., 2014; Lee et al., 2012).

Las trampas para la captura masiva de insectos se han utilizado desde comienzos del siglo XX (Gómez-Clemente, 1929; Planes, 1959). Desde entonces, se han desarrollado muchas variantes de estas y se han utilizado para el control de un gran número de especies de insectos. Sin embargo, aquellas basadas en el uso de volátiles microbianos se restringen principalmente al control de moscas. Al igual que los atracticidas, el uso de trampas para la captura masiva se basa en la reducción de las poblaciones efectivas, sin embargo, el gran número de trampas requeridas para su aplicación —factor que eleva de forma considerable los costos— las han hecho poco apetecidas. Aunque se ha demostrado que el sistema puede ser tan efectivo como el uso de atracticidas (Alemany et al., 2004; Ros et al., 1999), este método solo se comenzó a utilizar de forma extensiva en el siglo XXI, y aunque se utiliza en cerca de 100.000 ha en el Mediterráneo, está siendo reemplazado paulatinamente por el uso de atracticidas (Piñero et al., 2014). La amplia experiencia que ya existe en el control de moscas de la fruta mediante este método facilitará el desarrollo de estrategias parecidas para otras especies de moscas, entre ellas, las moscas hematófagas que afectan el sector pecuario.

Perspectivas

El uso de agroquímicos es el método de control más frecuentemente utilizado en la agricultura. Sin embargo, las preocupaciones ambientales y la creciente demanda de los consumidores por productos limpios y producidos de forma sostenible han llevado al desarrollo de métodos alternativos de protección de cultivos.

Los volátiles microbianos, ya sea como promotores de crecimiento o como agentes de control contra patógenos o insectos, son herramientas promisorias para el desarrollo de estrategias de control sostenibles. La bioprospección de hongos, levaduras y bacterias con este propósito es incipiente. De los millones de especies que existen sobre la tierra, solo se han descrito cerca de 10.000 y alrededor de 1.000 mVOC, de los cuales solo unos pocos han sido evaluados en este contexto (Lemfack et al., 2014). Uno de los grandes retos a futuro es salir de los actuales organismos modelo y estudiar la biodiversidad de microorganismos y sus mVOC para hallar compuestos con aplicabilidad en la agricultura.

En los sistemas agrícolas, la mayoría de los estudios relacionados con patógenos se han enfocado en la rizosfera a través de estudios *in vitro*, con un número limitado de géneros de microorganismos modelo y la planta *Arabidopsis thaliana* (Bailly & Weisskopf, 2012; Bitas et al., 2013). El diseño de la mayoría de estos estudios no permite determinar si los efectos observados se dan por el efecto de los compuestos volátiles o por aquellos que interactúan con las raíces directamente.

Para el control de insectos, los estudios se han enfocado en el uso de mVOC como atrayentes, pero han ignorado su potencial como insecticidas o su efecto en la inducción de defensas contra insectos. Sin embargo, el uso de volátiles como plaguicidas directos debe ser evaluado con cuidado, ya que algunos mVOC que inhiben el crecimiento de patógenos o controlan poblaciones de insectos pueden ser altamente tóxicos para los humanos (Kanchiswamy et al., 2015a).

Otro reto del uso en campo de los mVOC para el control de patógenos y promoción de crecimiento es el desarrollo de métodos adecuados de aplicación. La alta presión de vapor de estas sustancias conlleva una alta pérdida de sus componentes. Además, los microorganismos, bajo condiciones reales, liberan volátiles en muy bajas cantidades. Con los métodos de dispersión de volátiles que se utilizan en la actualidad, es difícil replicar la baja tasa de emisión natural de mVOC (Heuskin et al., 2011; Roy et al., 2014). En muchos casos, cuando los compuestos se evalúan individualmente en el laboratorio, suelen ser aplicados sobre papel filtro en concentraciones superiores a las liberadas por los microorganismos y con dinámicas de liberación muy diferentes. Aunque los desarrollos en la formulación de feromonas de insectos resuelven en parte

estos problemas, las formulaciones de voc normalmente están diseñadas para liberar grandes cantidades de volátiles. Estas formulaciones pueden servir como atrayentes de insectos, pero la aplicación de dosis altas de mVOC puede estresar las plantas o tener efectos inconsistentes sobre los patógenos o el crecimiento plantas (Farag et al., 2013; Kessler & Baldwin, 2001).

Antes de utilizar estos dispensadores para liberar mVOC con el fin de controlar patógenos o promocionar el crecimiento, es necesario verificar si las concentraciones altas de estos tienen el mismo efecto o si es necesario diseñar formulaciones que liberen concentraciones sumamente bajas. Este problema se vuelve aún mayor cuando se trata de utilizar los mVOC para manejar patógenos de suelo, ya que las formulaciones existentes no están desarrolladas con este fin. Para este propósito se requiere de un mayor entendimiento de la forma en que los volátiles se mueven en el suelo y desarrollar formulaciones de liberación lenta.

Los problemas de formulación se complican si se tiene en cuenta que la actividad de los mVOC suele ser el resultado de mezclas de varios compuestos. Estas mezclas, en proporciones similares a las producidas por los microorganismos, rara vez son evaluadas (Bitas et al., 2013). Al tener diferentes presiones de vapor, las formulaciones de mezclas son más complicadas, ya que aumenta el número de compuestos y se pueden requerir dispensadores o puntos de liberación diferentes para lograr un buen efecto (Pickett & Khan, 2016).

Existen muchas preguntas abiertas cuyas respuestas facilitarían la implementación de estos compuestos. Probablemente, una de las más importantes tiene que ver con determinar el mecanismo de percepción y acción de los compuestos volátiles por parte de plantas y patógenos en la rizosfera y en la filosfera. Entender estos mecanismos permitirá contestar otras preguntas como esta: ¿se pueden aplicar los volátiles una sola vez en un momento crítico del desarrollo de la planta o enfermedad, o es necesaria la exposición continua? (Méndez-Vilas, 2013).

Estudios sistémicos de las comunidades de microbios asociados con diferentes plantas y ecosistemas permitirían entender la evolución y el papel de los mVOC en tales ecosistemas y comunidades microbianas (Bitas et al., 2013). El desarrollo de nuevos y más eficientes métodos de análisis químico, de bases de datos químicas más robustas y la capacidad de análisis numérico con nuevos y poderosos métodos estadísticos que faciliten el estudio de las mezclas de compuestos llevarán a resultados promisorios (Méndez-Vilas, 2013).

Existe una amplia evidencia de que los mVOC tienen efectos importantes sobre el crecimiento, el desarrollo y las defensas de las plantas, así como sobre el crecimiento de patógenos. Si los efectos observados en experimentos de laboratorio se logran extrapolar a los sistemas productivos, la exposición a volátiles o la inoculación de los cultivos con microorganismos que producen tales compuestos podrían convertirse en nuevas opciones sostenibles para la agricultura (Bailly & Weisskopf, 2012).

El estudio del uso de los mVOC está mucho más adelantado en el control de insectos. Sin embargo, siguen existiendo grandes retos y oportunidades para desarrollar su control sostenible. Al igual que en el control de patógenos, el reto más grande es la bioprospección de mVOC de nuevas y diferentes fuentes, principalmente, con el fin de encontrar nuevos compuestos repelentes o insecticidas. Los insectos han desarrollado

un sistema complejo de olfato que les ayuda a evitar ambientes nocivos. Los volátiles provenientes de entomopatógenos pueden ser de gran utilidad como repelentes y, combinados con volátiles atrayentes, se podrían utilizar para desarrollar estrategias de manejo *push-pull* (Cook et al., 2007).

Otra área que requiere de mayor estudio es el uso de mVOC como inductores de defensas contra insectos. Al igual que en el caso de la inducción de defensas contra patógenos, existen muy pocos estudios que establezcan una relación directa entre los mVOC y la inducción de defensas contra insectos. Es necesario establecer el mecanismo mediante el cual los volátiles inducen las defensas de las plantas, y seguir los estudios de prospección de estos compuestos con el fin de entender la forma en la que se podrían utilizar en condiciones de campo.

Para finalizar, hay grandes posibilidades de utilizar los mVOC como atrayentes en un mayor número de especies de insectos. Aunque parece ser que los dípteros son los más atraídos por los volátiles microbianos (Davis & Landolt, 2013), faltan estudios para determinar la atractividad en otros insectos. Más aún, dentro de los dípteros todavía existen oportunidades importantes para controlar especies invasivas y plagas del sector pecuario o para desarrollar e implementar programas de control más sostenibles para plagas que actualmente se manejan con insecticidas químicos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Alba Marina Cotes y a AGROSAVIA por la invitación para ser parte de este libro.

Referencias

Alemany, A., Miranda, M., Alonso, R., & Martín Escorza, C. (2004). Efficacy of C. *capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) female mass trapping. *IOBC/WPRS Bulletin*, *95*, 43-50.

Allan, S. A., Bernier, U. R., & Kline, D. L. (2006). Attraction of mosquitoes to volatiles associated with blood. *Journal of Vector Ecology*, *31*(1), 71-78. doi:10.3376/1081-1710(2006)31[71:aomtva]2.0.co;2.

Alpha, C. J., Campos, M., Jacobs-Wagner, C., & Strobel, S. A. (2015). Mycofumigation by the volatile organic compound-producing fungus *Muscodor albus* induces bacterial cell death through DNA damage. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(3), 1147-1156. doi:10.1128/AEM.03294-14.

Ann, Y. C. (2012). Rhizobacteria of pepper (*Piper nigrum*) and their antifungal activities. *African Journal of Microbiology Research*, *6*(19), 4185-4193. doi:0.5897/AJMR12.583.

Asari, S., Matzen, S., Petersen, M. A., Bejai, S., & Meijer, J. (2016). Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. *FEMS Microbiology Ecology*, *92*(6), fiw070. doi:10.1093/femsec/fiw070.

Bailly, A., & Weisskopf, L. (2012). The modulating effect of bacterial volatiles on plant growth: current knowledge and future challenges. *Plant Signaling & Behavior*, *7*(1), 79-85. doi:10.4161/psb.7.1.18418.

Baker, A. C. (1944). *A review of studies on the Mexican fruitfly and related Mexican species*. Recuperado de https://archive.org/details/reviewofstudieso531bake.

Baldacchino, F., Cadier, J., Porciani, A., Buatois, B., Dormont, L., & Jay-Robert, P. (2013). Behavioural and electrophysiological responses of females of two species of tabanid to volatiles in urine of different mammals. *Medical and Veterinary Entomology*, *27*(1), 77-85. doi:10.1111/j.1365-2915.2012.01022.x.

Baldwin, I. T. (2010). Plant volatiles. *Current Biology: CB*, *20*(9), R392-R397. doi:10.1016/j.cub.2010.02.052.

Barrozo, R. B., & Lazzari, C. R. (2006). Orientation response of haematophagous bugs to CO2: the effect of the temporal structure of the stimulus. *Journal of Comparative Physiology A-Neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology*, *192*(8), 827-831. doi:10.1007/s00359-006-0120-y.

Bateman, M. A., & Morton, T. C. (1981). The importance of ammonia in proteinaceous attractants for fruit flies (Family: Tephritidae). *Australian Journal of Agricultural Research*, *32*(6), 883. doi:10.1071/ar9810883.

Becher, P. G., Bengtsson, M., Hansson, B. S., & Witzgall, P. (2010). Flying the fly: Long-range flight behavior of *Drosophila melanogaster* to attractive odors. *Journal of Chemical Ecology*, *36*(6), 599-607. doi:10.1007/s10886-010-9794-2.

Becher, P. G., Flick, G., Rozpędowska, E., Schmidt, A., Hagman, A., Lebreton, S., … Thompson, K. (2012). Yeast, not fruit volatiles mediate *Drosophila melanogaster* attraction, oviposition and development. *Functional Ecology*, *26*(4), 822-828. doi:10.1111/j.1365-2435.2012.02006.x.

Berrada, I., Benkhemmar, O., Swings, J., Bendaou, N., & Amar, M. (2012). Selection of halophilic bacteria for biological control of tomato gray mould caused by *Botrytis cinerea*. *Phytopathologia Mediterranea*, *51*(3), 625-630. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-10627.

Birkett, M. A., Agelopoulos, N., Jensen, K. M. V., Jespersen, J. B., Pickett, J. A., Prijs, H. J., … Woodcock, C. M. (2004). The role of volatile semiochemicals in mediating host location and selection by nuisance and disease-transmitting cattle flies. *Medical and Veterinary Entomology*, *18*(4), 313-322. doi:10.1111/j.0269-283X.2004.00528.x.

Bitas, V., Kim, H. S., Bennett, J. W., & Kang, S. (2013). Sniffing on microbes: Diverse roles of microbial volatile organic compounds in plant health. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, *26*(8), 835-843. doi:10.1094/mpmi-10-12-0249-cr.

Blom, D., Fabbri, C., Eberl, L., & Weisskopf, L. (2011). Volatile-mediated killing of *Arabidopsis thaliana* by bacteria is mainly due to hydrogen cyanide. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(3), 1000-1008. doi:10.1128/AEM.01968-10.

Boyce, A., & Bartlett, B. R. (1941). Lures for the walnut husk fly. *Journal of Economic Entomology*, *34*(2), 318-318. doi:10.1093/jee/34.2.318.

Buttery, R. G., Ling, L. C., Teranishi, R., & Mon, T. R. (1983). Insect attractants: volatiles of hydrolyzed protein insect baits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *31*(4), 689-692. doi:10.1021/jf00118a003.

Castrejón-Gómez, V. R., Aluja, M., Arzuffi, R., & Villa, P. (2004). Two low-cost food attractants for capturing *Toxotrypana curvicauda* (Diptera: Tephritidae) in the field. *Journal of Economic Entomology*, *97*(2), 310-315. doi:10.1603/0022-0493-97.2.310.

Cha, D. H., Landolt, P. J., & Adams, T. B. (2017). Effect of chemical ratios of a microbial-based feeding attractant on trap catch of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *Environmental Entomology*, *46*(4), 907-915. doi:10.1093/ee/nvx079.

Chaurasia, B., Pandey, A., Palni, L. M., Trivedi, P., Kumar, B., & Colvin, N. (2005). Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. *Microbiological Research*, *160*(1), 75-81. doi:10.1016/j.micres.2004.09.013.

Chitarra, G. S., Abee, T., Rombouts, F. M., Posthumus, M. A., & Dijksterhuis, J. (2004). Germination of *Penicillium paneum* conidia is regulated by 1-octen-3-ol, a volatile self-inhibitor. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(5), 2823-2829. doi:10.1128/AEM.70.5.2823-2829.2004.

Christenson, L. D. (1963). The male annihilation technique in the control of fruit flies. En A. H. Stanley (Ed.), *New approaches to pest control and eradication* (pp. 31-35). Beltsville, EE. UU.: American Chemical Society Publications.

Christenson, L. D., & Foote, R. H. (1960). Biology of fruit flies. *Annual Review of Entomology*, *5*, 171-192. doi:10.1146/annurev.en.05.010160.001131.

Clavijo McCormick, A., Unsicker, S. B., & Gershenzon, J. (2012). The specificity of herbivore-induced plant volatiles in attracting herbivore enemies. *Trends in Plant Science*, *17*(5), 303-310. doi:10.1016/j.tplants.2012.03.012.

Cook, S. M., Khan, Z. R., & Pickett, J. A. (2007). The use of push-pull strategies in integrated pest management. *Annual Review of Entomology*, *52*, 375-400.

Cortés-Barco, A. M., Goodwin, P. H., & Hsiang, T. (2010). Comparison of induced resistance activated by benzothiadiazole, (2R,3R)-butanediol and an isoparaffin mixture against anthracnose of *Nicotiana benthamiana*. *Plant Pathology*, *59*(4), 643-653. doi:10.1111/j.1365-3059.2010.02283.x.

Cortés-Barco, A. M., Hsiang, T., & Goodwin, P. H. (2010). Induced systemic resistance against three foliar diseases of *Agrostis stolonifera* by (2R,3R)-butanediol or an isoparaffin mixture. *Annals of Applied Biology*, *157*(2), 179-189. doi:10.1111/j.1744-7348.2010.00417.x.

Daisy, B. H., Strobel, G. A., Castillo, U., Ezra, D., Sears, J., Weaver, D. K., & Runyon, J. B. (2002). Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*, *148*(Pt 11), 3737-3741.

Davis, T. S., & Landolt, P. J. (2013). A survey of insect assemblages responding to volatiles from a ubiquitous fungus in an agricultural landscape. *Journal of Chemical Ecology*, *39*(7), 860-868. doi:10.1007/s10886-013-0278-z.

Dean, R. (1941). Attraction of *Rhagoletis pomonella* adults to protein Baits. *Journal of Economic Entomology*, *34*, 123-123. doi:10.1093/jee/34.1.123a.

Dekker, T., Geier, M., & Carde, R. T. (2005). Carbon dioxide instantly sensitizes female yellow fever mosquitoes to human skin odours. *The Journal of Experimental Biology*, *208*(Pt 15), 2963-2972. doi:10.1242/jeb.01736.

Dicke, M., Van Poecke, R. M. P., & De Boer, J. G. (2003). Inducible indirect defence of plants: from mechanisms to ecological functions. *Basic and Applied Ecology*, *4*(1), 27-42. doi:10.1078/1439-1791-00131.

Dong, F., Fu, X., Watanabe, N., Su, X., & Yang, Z. (2016). Recent advances in the emission and functions of plant vegetative volatiles. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *21*(2), 124. doi:10.3390/molecules21020124.

Dowell, R. V., Siddiqui, I. A., Meyer, F., & Spaugy, E. L. (1999). Early results suggest sterile flies may protect S. California from medfly. *California Agriculture*, *53*(2), 28-32. doi:10.3733/ca.v053n02p28.

Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, J. K., & Kaplan, I. (2013). Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *The New Phytologist*, *198*(1), 16-32. doi:10.1111/nph.12145.

Effmert, U., Kalderas, J., Warnke, R., & Piechulla, B. (2012). Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. *Journal of Chemical Ecology*, *38*(6), 665-703. doi:10.1007/s10886-012-0135-5.

El-Sayed, A. M., Heppelthwaite, V. J., Manning, L. M., Gibb, A. R., & Suckling, D. M. (2005). Volatile constituents of fermented sugar baits and their attraction to lepidopteran species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(4), 953-958. doi:10.1021/jf048521j.

Epsky, N. D., Espinoza, H. R., Kendra, P. E., Abernathy, R., Midgarden, D., & Heath, R. R. (2010). Effective sampling range of a synthetic protein-based attractant for *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, *103*(5), 1886-1895. doi:10.1603/EC09286.

Epsky, N. D., Heath, R. R., Guzmán, A., & Meyer, W. L. (1995). Visual cue and chemical cue interactions

in a dry trap with food–based synthetic attractant for *Ceratitis capitata* and *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Environmental Entomology, 24*(6), 1387-1395. doi:10.1093/ee/24.6.1387.

Eyer, J. R., & Medler, J. T. (1940). Attractiveness to Codling Moth of substances related to those elaborated by heterofermentative bacteria in baits. *Journal of Economic Entomology, 33*(6), 933-940. doi:10.1093/jee/33.6.933.

Eyer, J. R., Medler, J. T., & Linton, H. L. (1937). Analysis of attrahent factors in fermenting baits used for Codling Moth. *Journal of Economic Entomology, 30*(5), 750-756. doi:10.1093/jee/30.5.750.

Ezquer, I., Li, J., Ovecka, M., Baroja-Fernandez, E., Munoz, F. J., Montero, M., ... Pozueta-Romero, J. (2010). Microbial volatile emissions promote accumulation of exceptionally high levels of starch in leaves in mono- and dicotyledonous plants. *Plant and Cell Physiology, 51*(10), 1674-1693. doi:10.1093/pcp/pcq126.

Farag, M. A., Zhang, H., & Ryu, C. M. (2013). Dynamic chemical communication between plants and bacteria through airborne signals: Induced resistance by bacterial volatiles. *Journal of Chemical Ecology, 39*(7), 1007-1018. doi:10.1007/s10886-013-0317-9.

Fernando, W. G. D., Ramarathnam, R., Krishnamoorthy, A. S., & Savchuk, S. C. (2005). Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biology and Biochemistry, 37*(5), 955-964. doi:10.1016/j.soilbio.2004.10.021.

Fiddaman, P. J., & Rossall, S. (1994). Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Microbiology, 76*(4), 395-405. doi:10.1111/j.1365-2672.1994.tb01646.x.

Fiedler, K., Schutz, E., & Geh, S. (2001). Detection of microbial volatile organic compounds (mVOC) produced by moulds on various materials. *International Journal of Hygiene and Environmental Health, 204*(2-3), 111-121. doi:10.1078/1438-4639-00094.

Fiers, M., Lognay, G., Fauconnier, M.-L., & Jijakli, M. H. (2013). Volatile compound-mediated interactions between barley and pathogenic fungi in the soil. *PLoS One, 8*(6), e66805. doi:10.1371/journal.pone.0066805.

Foltan, P., & Puza, V. (2009). To complete their life cycle, pathogenic nematode–bacteria complexes deter scavengers from feeding on their host cadaver. *Behavioural Processes, 80*(1), 76-79. doi:10.1016/j.beproc.2008.09.012.

Frick, K. E. (1952). Determining emergence of the cherry fruit fly with ammonium carbonate bait traps. *Journal of Economic Entomology, 45*(2), 262-263. doi:10.1093/jee/45.2.262.

Frost, S. W. (1937). Tests on baits for Oriental Fruit Moths, 1936. *Journal of Economic Entomology, 30*(5), 693-695. doi:10.1093/jee/30.5.693.

Garbeva, P., Hordijk, C., Gerards, S., & De Boer, W. (2014). Volatile-mediated interactions between phylogenetically different soil bacteria. *Frontiers in Microbiology, 5*, 289. doi:10.3389/fmicb.2014.00289.

Goates, B. J., & Mercier, J. (2009). Effect of biofumigation with volatiles from *Muscodor albus* on the viability of *Tilletia spp*. teliospores. *Canadian Journal of Microbiology, 55*(2), 203-206. doi:10.1139/w08-104.

Gómez-Clemente, F. (1929). Experiencias de lucha contra la *Ceratitis capitata* con cazamoscas de vidrio. *Boletín de Patología Vegetal y Entomología Agrícola, 4*, 21-38.

Gow, P. L. (1954). Proteinaceous bait for the oriental fruit fly. *Journal of Economic Entomology, 47*(1), 153-160. doi:10.1093/jee/47.1.153.

Green, N., Beroza, M., & Hall, S. A. (1960). Recent developments in chemical attractants for insects. *Advances in Pest Control Research, 3*, 129-179.

Gutiérrez-Luna, F. M., López-Bucio, J., Altamirano-Hernández, J., Valencia-Cantero, E., De la Cruz, H. R., & Macías-Rodríguez, L. (2010). Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. *Symbiosis 51*(1), 75-83. doi:10.1007/s13199-010-0066-2.

Ha, A., Larson, K., Harvey, S., Fisher, B., & Malcolm, B. (2010). *Benefit-cost analysis of options for managing Queensland fruit fly in Victoria.* Melbourne, EE. UU.: Department of Primary Industries.

Hamby, K. A., & Becher, P. G. (2016). Current knowledge of interactions between *Drosophila suzukii* and microbes, and their potential utility for pest management. *Journal of Pest Science, 89*(3), 621-630. doi:10.1007/s10340-016-0768-1.

Harman, G. E. (2011). *Trichoderma*—not just for biocontrol anymore. *Phytoparasitica, 39*(2), 103-108. doi:10.1007/s12600-011-0151-y.

Heath, R. R., Epsky, N. D., Dueben, B. D., Rizzo, J., & Jeronimo, F. (1997). Adding methyl-substituted ammonia derivatives to a food-based synthetic attractant on capture of the Mediterranean and Mexican fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology, 90*(6), 1584-1589. doi:10.1093/jee/90.6.1584.

Heath, R. R., Epsky, N. D., Midgarden, D., & Katsoyannos, B. I. (1995). Efficacy of 1,4-diaminobutane (putrescine) in a food-based synthetic attractant for capture of Mediterranean and Mexican fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology, 97*(3), 1126-1131. doi:10.1603/0022-0493(2004)097[1126:EODPIA]2.0.CO;2.

Hendrichs, J., & Hendrichs, M. A. (1990). Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in nature: Location and diel pattern of feeding and other activities on

fruiting and nonfruiting hosts and nonhosts. *Annals of the Entomological Society of America*, *83*(3), 632-641. doi:10.1093/aesa/83.3.632.

Heuskin, S., Lorge, S., Godin, B., Leroy, P., Frere, I., Verheggen, F. J., ... Lognay, G. (2011). Optimisation of a semiochemical slow-release alginate formulation attractive towards *Aphidius ervi* Haliday parasitoids. *Pest Management Science*, *68*(1), 127-136. doi:10.1002/ps.2234.

Hodson, A. C. (1943). Lures attractive to the apple maggot. *Journal of Economic Entomology*, *36*(4), 545-548. doi:10.1093/jee/36.4.545.

Honda, H., Ishiwatari, T., & Matsumoto, Y. (1988). Fungal volatiles as oviposition attractants for the yellow peach moth, *Conogethes punctiferalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Insect Physiology*, *34*(3), 205-211. doi:10.1016/0022-1910(88)90051-0.

Huang, C. J., Tsay, J. F., Chang, S. Y., Yang, H. P., Wu, W. S., & Chen, C. Y. (2012). Dimethyl disulfide is an induced systemic resistance elicitor produced by *Bacillus cereus* C1L. *Pest Management Science*, 68(9), 1306-1310. doi:10.1002/ps.3301.

Hung, R., Lee, S., & Bennett, J. W. (2013). *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma volatile* organic compounds. *Fungal Ecology*, *6*(1), 19-26. doi:10.1016/j.funeco.2012.09.005.

Hussain, A., Tian, M.-Y., He, Y.-R., Bland, J. M., & Gu, W.-X. (2010). Behavioral and electrophysiological responses of *Coptotermes formosanus* Shiraki towards entomopathogenic fungal volatiles. *Biological Control*, *55*(3), 166-173. doi:10.1016/j.biocontrol.2010.08.009.

Hutchings, M. L., Alpha-Cobb, C. J., Hiller, D. A., Berro, J., & Strobel, S. A. (2017). Mycofumigation through production of the volatile DNA-methylating agent N-methyl-N-nitrosoisobutyramide by fungi in the genus *Muscodor*. *The Journal of Biological Chemistry*, *292*(18), 7358-7371. doi:10.1074/jbc.M117.779009.

Insam, H., & Seewald, M. S. A. (2010). Volatile organic compounds (VOC) in soils. *Biology and Fertility of Soils*, *46*(3), 199-213. doi:10.1007/s00374-010-0442-3.

Isaac, J., 1905. *Report of the commissioner appointed to investigate the prevalence of Trypeta Ludens in Mexico: Districts affected by the orange worm. Nature, habits, and extension of the pest. Methods adopted for its control. Danger to be apprehended from its introduction, etc.* Sacramento, EE. UU.: WW Shannon, Superintendent State Printing.

Jaber, L. R., & Vidal, S. (2010). Fungal endophyte negative effects on herbivory are enhanced on intact plants and maintained in a subsequent generation. *Ecological Entomology*, *35*(1), 25-36. doi:10.1111/j.1365-2311.2009.01152.x.

Jeanbourquin, P., & Guerin, P. M. (2007a). Chemostimuli implicated in selection of oviposition substrates by the stable fly *Stomoxys calcitrans*. *Medical and Veterinary Entomology*, *21*(3), 209-216. doi:10.1111/j.1365-2915.2007.00685.x.

Jeanbourquin, P., & Guerin, P. M. (2007b). Sensory and behavioural responses of the stable fly *Stomoxys calcitrans* to rumen volatiles. *Medical and Veterinary Entomology*, *21*(3), 217-224. doi:10.1111/j.1365-2915.2007.00686.x.

Jones, O. T. (1998). Practical applications of pheromones and other semiochemicals. En P. E. Howse, I. D. R. Stevens, & O. T. Jones (Eds.), *Insect pheromones and their use in pest management* (pp. 263-355). Londres, Inglaterra: Chapman & Hall.

Joo, Y., Schuman, M. C., Goldberg, J. K., Kim, S.-G., Yon, F., Brütting, C., & Baldwin, I. T. (2017). Herbivore-induced volatile blends with both "fast" and "slow" components provide robust indirect defense in nature. *Functional Ecology*, *32*, 136-149. doi:10.1111/1365-2435.12947.

Kai, M., Effmert, U., Berg, G., & Piechulla, B. (2007). Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Archives of Microbiology*, *187*(5), 351-360. doi:10.1007/s00203-006-0199-0.

Kai, M., Haustein, M., Molina, F., Petri, A., Scholz, B., & Piechulla, B. (2009). Bacterial volatiles and their action potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *81*(6), 1001-1012. doi:10.1007/s00253-008-1760-3.

Kanchiswamy, C. N., Malnoy, M., & Maffei, M. E. (2015a). Bioprospecting bacterial and fungal volatiles for sustainable agriculture. *Trends in Plant Science*, *20*(4), 206-211. doi:10.1016/j.tplants.2015.01.004.

Kanchiswamy, C. N., Malnoy, M., & Maffei, M. E. (2015b). Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Frontiers in Plant Science*, *6*, 151. doi:10.3389/fpls.2015.00151.

Keiser, I., Jacobson, M., Nakagawa, S., Miyashita, D. H., & Harris, E. J. (1976). Mediterranean Fruit Fly: Attraction of females to acetic acid and acetic anhydride, to two chemical intermediates in the manufacture of Cue-lure and to decaying Hawaiian tephritids. *Journal of Economic Entomology*, *69*(4), 517-520. doi:10.1093/jee/69.4.517.

Kessler, A., & Baldwin, I. T. (2001). Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*, *291*(5511), 2141-2144. doi:10.1126/science.291.5511.2141.

Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R., & Takabayashi, J. (2007). Volatile 1-octen-3-ol induces a defensive response in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of General Plant Pathology*, *73*(1), 35-37. doi:10.1007/s10327-006-0314-8.

Kleiber, J. R., Unelius, C. R., Lee, J. C., Suckling, D. M., Qian, M. C., & Bruck, D. J. (2014). Attractiveness of

fermentation and related products to Spotted Wing *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae). *Environmental Entomology*, *43*(2), 439-447. doi:10.1603/EN13224.

Korpi, A., Jarnberg, J., & Pasanen, A. L. (2009). Microbial volatile organic compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, *39*(2), 139-193. doi:10.1080/10408440802291497.

Krcmar, S., Mikuska, A., & Merdic, E. (2006). Response of Tabanidae (Diptera) to different natural attractants. *Journal of Vector Ecology*, *31*(2), 262-265.

Lacey, L. A., Horton, D. R., Jones, D. C., Headrick, H. L., & Neven, L. G. (2009). Efficacy of the biofumigant fungus *Muscodor albus* (Ascomycota: Xylariales) for control of Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) in simulated storage conditions. *Journal of Economic Entomology*, *102*(1), 43-49. doi:10.1603/029.102.0107.

Lacey, L. A., & Neven, L. G. (2006). The potential of the fungus, *Muscodor albus*, as a microbial control agent of potato tuber moth (Lepidoptera: Gelechiidae) in stored potatoes. *Journal of Invertebrate Pathology*, *91*(3), 195-198. doi:10.1016/j.jip.2006.01.002.

Lebreton, S., Borrero-Echeverry, F., Gonzalez, F., Solum, M., Wallin, E.A., Hedenström, E., ... Witzgall, P. (2017). A Drosophila female pheromone elicits species-specific long-range attraction via an olfactory channel with dual specificity for sex and food. *BMC Biology*, *15*, 88. doi:10.1186/s12915-017-0427-x.

Lee, J. C., Burrack, H. J., Barrantes, L. D., Beers, E. H., Dreves, A. J., Hamby, K. A., ... Bruck, D. J. (2012). Evaluation of monitoring traps for *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in North America. *Journal of Economic Entomology*, *105*(4), 1350-1357. doi:10.1603/EC12132.

Lee, S. O., Kim, H. Y., Choi, G. J., Lee, H. B., Jang, K. S., Choi, Y. H., & Kim, J. C. (2009). Mycofumigation with *Oxyporus latemarginatus* EF069 for control of postharvest apple decay and *Rhizoctonia* root rot on moth orchid. *Journal of Applied Microbiology*, *106*(4), 1213-1219. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.04087.x.

Lemfack, M. C., Nickel, J., Dunkel, M., Preissner, R., & Piechulla, B. (2014). mVOC: a database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Research*, *42*(Database issue), D744-748. doi:10.1093/nar/gkt1250.

Li, Q., Ning, P., Zheng, L., Huang, J., Li, G., & Hsiang, T. (2012). Effects of volatile substances of *Streptomyces globisporus* JK-1 on control of *Botrytis cinerea* on tomato fruit. *Biological Control*, *61*(2), 113-120. doi:10.1016/j.biocontrol.2011.10.014.

Liu, W.-w., Mu, W., Zhu, B.-y., Du, Y.-c., & Liu, F. (2008). Antagonistic activities of volatiles from four strains of *Bacillus spp*. and *Paenibacillus spp*. against soil-borne plant pathogens. *Agricultural Sciences in China*, *7*(9), 1104-1114. doi:10.1016/s1671-2927(08)60153-4.

Liu, X.-M., & Zhang, H. (2015). The effects of bacterial volatile emissions on plant abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, *6*, 774. doi:10.3389/fpls.2015.00774.

Madubunyi, L. C., Hassanali, A., Ouma, W., Nyarango, D., & Kabii, J. (1996). Chemoecological role of mammalian urine in host location by tsetse, *Glossina* spp. (Diptera: Glossinidae). *Journal of Chemical Ecology*, *22*(6), 1187-1199. doi:10.1007/bf02027954.

Majeed, S., Hill, S. R., Birgersson, G., & Ignell, R. (2016). Detection and perception of generic host volatiles by mosquitoes modulate host preference: context dependence of (R)-1-octen-3-ol. *Royal Society Open Science*, *3*(11), 160467. doi:10.1098/rsos.160467.

Mangan, R. L., & Thomas, D. B. (2014). Comparison of torula yeast and various grape juice products as attractants for mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, *107*(2), 591-600. doi:10.1603/EC12376.

Martínez, G. S., & López, F. H. (2010). *Manual técnico del trampeo preventivo contra moscas exóticas de la fruta*. Recuperado de http://www.programamoscamed.mx/EIS/biblioteca/libros/manualp/Manual%20Operativo%20Trampeo%20Moscas%20Exoticas_2010_%20.pdf.

Martini, X., Pelz-Stelinski, K. S., & Stelinski, L. L. (2014). Plant pathogen-induced volatiles attract parasitoids to increase parasitism of an insect vector. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *2*, 8. doi:10.3389/fevo.2014.00008.

Mazor, M., Gothilf, S., & Galun, R. (1987). The role of ammonia in the attraction of females of the Mediterranean fruit fly to protein hydrolysate baits. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *43*(1), 25-29. doi:10.1111/j.1570-7458.1987.tb02198.x.

McPhail, M. (1939). Protein lures for fruit flies. *Journal of Economic Entomology*, *32*(6), 758-761. doi:10.1093/jee/32.6.758.

Meats, A., Clift, A., & Perepelicia, N. (2002). Performance of permanent and supplementary traps for Mediterranean and Queensland fruit flies in South Australia 1975-2001: Comparison of male lure and food lure traps. *General and Applied Entomology*, *31*, 53.

Meats, A. W., Clift, A. D., & Robson, M. K. (2003). Incipient founder populations of mediterranean and queensland fruit flies in Australia: the relation of trap catch to infestation radius and models for quarantine radius. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, *43*(4), 397-406. doi:10.1071/EA02070.

Méndez-Vilas, A. (2013). *Microbial pathogens and strategies for combating them: Science, technology and education*. Badajoz, España: Formatex Research Center.

Mercier, J., & Jiménez, J. I. (2004). Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodor*

albus. *Postharvest Biology and Technolo*, *31*(1), 1-8. doi:10.1016/j.postharvbio.2003.08.004.

Minerdi, D., Bossi, S., Maffei, M. E., Gullino, M. L., & Garibaldi, A. (2011). *Fusarium oxysporum* and its bacterial consortium promote lettuce growth and expansin A5 gene expression through microbial volatile organic compound (MVOC) emission. *FEMS Microbiology Ecology*, *76*(2), 342-351. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01051.x.

Mitchell, A. M., Strobel, G. A., Moore, E., Robison, R., & Sears, J. (2010). Volatile antimicrobials from *Muscodor crispans*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*, *156*(Pt. 1), 270-277. doi:10.1099/mic.0.032540-0.

Miyagawa, H., Inoue, M., Yamanaka, H., Tsurushima, T., & Ueno, T. (2000). Chemistry of spore germination self-inhibitors from the plant pathogenic fungus *Colletotrichum fragariae*. In D. R. Baker, & N. Ken Umetsu (Eds.), *Agrochemical discovery: Insect, weed, and fungal control* (pp. 62-71). Washington, EE. UU.: American Chemical Society.

Mukabana, W. R., Mweresa, C. K., Otieno, B., Omusula, P., Smallegange, R. C., Van Loon, J. J. A., & Takken, W. (2012). A novel synthetic odorant blend for trapping of malaria and other African mosquito species. *Journal of Chemical Ecology*, *38*(3), 235-244. doi:10.1007/s10886-012-0088-8.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/International Atomic Energy Agency (FAO/IAEA). (2009). *Development of bait stations for fruit fly suppression in support of SIT* (Reporte IAEA-314. D4 08CT11588, Report and recommendations of a consultants group meeting, Mazatlan, Mexico, 30 October-1 November 2008). Recuperado de http://www-naweb.iaea.org/nafa/ipc/public/ipc-bait-stations-january-2010.pdf.

Park, Y. S., Dutta, S., Ann, M., Raaijmakers, J. M., & Park, K. (2015). Promotion of plant growth by *Pseudomonas fluorescens* strain SS101 via novel volatile organic compounds. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *461*(2), 361-365. doi:10.1016/j.bbrc.2015.04.039.

Peterson, A. (1925). A bait which attracts the Oriental Peach Moth (*Laspeyresia molesta* Busck). *Journal of Economic Entomology*, *18*(1), 181-190. doi:10.1093/jee/18.1.181.

Pickett, J. A., & Khan, Z. R. (2016). Plant volatile-mediated signalling and its application in agriculture: successes and challenges. *The New Phytolist*, *212*(4), 856-870. doi:10.1111/nph.14274.

Pinto, M. C., Campbell-Lendrum, D. H., Lozovei, A. L., Teodoro, U., & Davies, C. R. (2001). Phlebotomine sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field. *Medical and Veterinary Entomology*, *15*(2), 132-139. doi:10.1046/j.1365-2915.2001.00294.x.

Piñero, J., Aluja, M., Vázquez, A., Equihua, M., & Varón, J. (2003). Human urine and chicken feces as fruit fly (Diptera: Tephritidae) attractants for resource-poor fruit growers. *Journal of Economical Entomology*, *96*(2), 334-340. doi:10.1603/0022-0493-96.2.334.

Piñero, J. C., Enkerlin, W., & Epsky, N. D. (2014). Recent developments and applications of bait stations for integrated pest management of Tephritid Fruit Flies. En T. Shelly, N. Epsky, E. B. Jang, J. Reyes-Flores, & R. Vargas (Eds.), *Trapping and the detection, control, and regulation of Tephritid Fruit Flies: Lures, area-wide programs, and trade implications* (pp. 457-492). Dordrecht, Holanda: Springer.

Planes, S. (1959). Estado actual de los medios de lucha contra la mosca de los frutos, *Ceratitis capitata*, y mosca del olivo, *Dacus oleae*. *Boletín de Patología Vegetal y Entomología Agrícola*, *24*, 51-66.

Prokopy, R. J. (1975). Apple maggot control by sticky red spheres. *Journal of Economic Entomology*, *68*(2), 197-198. doi:10.1093/jee/68.2.197.

Quesada, R., Triana, E., Vargas, G., Douglass, J. K., Seid, M. A., Niven, J. E., ... Wcislo, W. T. (2011). The allometry of CNS size and consequences of miniaturization in orb-weaving and cleptoparasitic spiders. *Arthropod Structure & Development*, *40*(6), 521-529. doi:10.1016/j.asd.2011.07.002.

Quilici, S., Franck, A., Duyck, P. F., Rousse, P., Ryckewaert, P., & Simiand, C. (2007). *Development of improved attractants and their integration into fruit fly SIT management programmes: final report for the period 2001-2005*. Recuperado de https://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/te_1574_web.pdf.

Raz, D. (1997). The phenology of the fig fly and its control. *Acta horticulturae*, *480*, 207-208. doi:10.17660/ActaHortic.1998.480.35.

Robacker, D. C., García, J. A., & Bartelt, R. J. (2000). Volatiles from duck feces attractive to Mexican fruit fly. *Journal of Chemical Ecology*, *26*(8), 1849-1867. doi:10.1023/a:1005544723521.

Robacker, D. C., & Warfield, W. C. (1993). Attraction of both sexes of Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens*, to a mixture of ammonia, methylamine, and putrescine. *Journal of Chemical Ecology*, *19*(12), 2999-3016. doi:10.1007/bf00980598.

Romoli, R., Papaleo, M. C., De Pascale, D., Tutino, M. L., Michaud, L., LoGiudice, A., ... Bartolucci, G. (2013). GC-MS volatolomic approach to study the antimicrobial activity of the antarctic bacterium *Pseudoalteromonas sp*. TB41. *Metabolomics*, *10*(1), 42-51. doi:10.1007/s11306-013-0549-2.

Ros, J. P., Escobar, I., García Tapia, F. J., & Aranda, G. (1999). Pilot experiment to control Medfly, *Ceratitis capitata*

(Wied.) (Diptera: Tephritidae) using mass trapping technique in a custard apple (*Annona cherimola* Mill.) orchard. *Fifth International Symposium on Fruit Flies of Economi Importance* (pp. 639-643). Penang, Malasya: Penerbit Universiti Sains Malaysia.

Roy, A., Singh, S. K., Bajpai, J., & Bajpai, A. K. (2014). Controlled pesticide release from biodegradable polymers. *Central European Journal of Chemistry*, *12*(4), 453-469. doi:10.2478/s11532-013-0405-2.

Rudrappa, T., Biedrzycki, M. L., Kunjeti, S. G., Donofrio, N. M., Czymmek, K. J., Paré, P. W., & Bais, H. P. (2010). The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Communicative and Integrative Biology*, *3*(2), 130-138. doi:10.4161/cib.3.2.10584.

Ryan, R. P., & Dow, J. M. (2008). Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. *Microbiology*, *154* (Pt 7), 1845-1858. doi:10.1099/mic.0.2008/017871-0.

Schalchli, H., Tortella, G. R., Rubilar, O., Parra, L., Hormazabal, E., & Quiroz, A. (2016). Fungal volatiles: An environmentally friendly tool to control pathogenic microorganisms in plants. *Critical Reviews in Biotechnology*, *36*(1), 144-152. doi:10.3109/07388551.2014.946466.

Schofield, S., & Brady, J. (1997). Effects of carbon dioxide, acetone and 1-octen-3-ol on the flight responses of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, in a wind tunnel. *Physiological Entomology*, *22*(4), 380-386.

Schulz, S., Dickschat, J. S., Kunze, B., Wagner-Dobler, I., Diestel, R., & Sasse, F. (2010). Biological activity of volatiles from marine and terrestrial bacteria. *Marine Drugs*, *8*(12), 2976-2987. doi:10.3390/md8122976.

Schunemann, M. A. (1984). *Programa Mosca del Mediterráneo*. Recuperado de http://www.programamoscamed.mx/EIS/biblioteca/libros/libros/P.M.M%20_1984.pdf.

Shelly, T., Nishimoto, J., & Kurashima, R. (2012). Trap capture of three economically important fruit fly species (Diptera: Tephritidae): evaluation of a solid formulation containing multiple male lures in a Hawaiian coffee field. *Journal of Economic Entomolgy*, *105*(4), 1186-1193. doi:10.1603/EC11371.

Shi, X., Chen, G., Tian, L., Peng, Z., Xie, W., Wu, Q., ... Zhang, Y. (2016). The salicylic acid-mediated release of plant volatiles affects the host choice of *Bemisia tabaci*. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(7), 1048. doi:10.3390/ijms17071048.

Song, G. C., & Ryu, C.-M. (2013). Two volatile organic compounds trigger plant self-defense against a bacterial pathogen and a sucking insect in cucumber under open field conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(5), 9803-9819. doi:10.3390/ijms14059803.

Spinelli, F., Cellini, A., Marchetti, L., Nagesh, K. M., & Piovene, C. (2011). Emission and function of volatile organic compounds in response to abiotic stress. En A. Shanker, & B. Venkateswarlu (Eds.), *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations* (pp. 367-394). Rijeka, Croatia: InTech.

Splivallo, R., Fischer, U., Göbel, C., Feussner, I., & Karlovsky, P. (2009). Truffles regulate plant root morphogenesis via the production of auxin and ethylene. *Plant Physiology*, *150*, 2018-2029. doi:10.1104/pp.109.141325.

Starr, D. F., & Shaw, J. G. (1944). Pyridine as an attractant for the Mexican fruitfly. *Journal of Economic Entomology*, *37*(6), 760-763. doi:10.1093/jee/37.6.760.

Stensmyr, M. C., Dweck, H. K., Farhan, A., Ibba, I., Strutz, A., Mukunda, L., ... Bill, S. (2012). A conserved dedicated olfactory circuit for detecting harmful microbes in *Drosophila*. *Cell*, *151*(6), 1345-1357. doi:10.1016/j.cell.2012.09.046.

Strobel, G. (2006). *Muscodor albus* and its biological promise. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *33*(7), 514. doi:10.1007/s10295-006-0090-7.

Tahir, H. A. S., Gu, Q., Wu, H., Raza, W., Hanif, A., Wu, L., ... Gao, X. (2017). Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 171. doi:10.3389/fmicb.2017.00171.

Tangtrakulwanich, K., Albuquerque, T., Brewer, G. J., Baxendale, F. P., Zurek, L., Miller, ... Zhu, J. J. (2015). Behavioural responses of stable flies to cattle manure slurry associated odourants. *Medical and Veterinary Entomology*, *29*(1), 82-87. doi:10.1111/mve.12103.

Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., ... Bisignano, G. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, *49*(6), 2474-2478. doi:10.1128/AAC.49.6.2474-2478.2005.

Vargas, R. I., Mau, R. L., & Jang, E. B. (2007). The Hawaii fruit fly area-wide pest management program: Accomplishments and future directions. *Proceedings of Hawaiian Entomological Society*, *39*, 99-104.

Vargas, R. I., Souder, S. K., MacKey, B., Cook, P., Morse, J. G., & Stark, J. D. (2012). Field trials of solid triple lure (Trimedlure, methyl eugenol, raspberry ketone, and DDVP) dispensers for detection and male annihilation of *Ceratitis capitata*, *Bactrocera dorsalis*, and *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) in Hawaii. *Journal of Economic Entomology*, *105*(5), 1557-1565. doi:10.1603/EC12122.

Vargas, R. I., Stark, J. D., Kido, M. H., Ketter, H. M., & Whitehand, L. C. (2000). Methyl eugenol and cue-lure traps for suppression of male oriental fruit flies and melon flies (Diptera: Tephritidae) in Hawaii: effects of lure mixtures and weathering. *Journal of Economic Entomology*, *93*(1), 81-87. doi:10.1603/0022-0493-93.1.81.

Wan, M., Li, G., Zhang, J., Jiang, D., & Huang, H.-C. (2008). Effect of volatile substances of *Streptomyces platensis* F-1 on control of plant fungal diseases. *Biological Control*, *46*(3), 552-559. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.05.015.

Wheatley, R. E. (2002). The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *81*(1-4), 357-364. doi:10.1023/A:1020592802234.

Xiao, Y., Wang, Q., Erb, M., Turlings, T. C. J., Ge, L., Hu, L., ... Lou, Y. (2012). Specific herbivore-induced volatiles defend plants and determine insect community composition in the field. *Ecology Letters*, *15*(10), 1130-1139. doi:10.1111/j.1461-0248.2012.01835.x.

Yanagawa, A., Fujiwara-Tsujii, N., Akino, T., Yoshimura, T., Yanagawa, T., & Shimizu, S. (2011). Musty odor of entomopathogens enhances disease-prevention behaviors in the termite *Coptotermes formosanus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *108*(1), 1-6. doi:10.1016/j.jip.2011.06.001.

Yee, W. L., Lacey, L. A., & Bishop, B. J. B. (2009). Pupal mortality and adult emergence of western cherry fruit fly (Diptera: Tephritidae) exposed to the fungus *Muscodor albus* (Xylariales: Xylariaceae). *Journal of Economic Entomology*, *102*(6), 2041-2047. doi:10.1603/029.102.0604.

Yetter, W. P., & Steiner, L. F. (1931). A preliminary report on large-scale bait trapping of the oriental fruit moth in Indiana and Georgia. *Journal of Economic Entomology*, *24*(1), 1181-1197. doi:10.1093/jee/24.6.1181.

Zhang, A., Linn, J. C., Wright, S., Prokopy, R., Reissig, W., & Roelofs, W. (1999). Identification of a new blend of apple volatiles attractive to the Apple Maggot, *Rhagoletis pomonella*. *Journal of Chemical Ecology*, *25*(6), 1221-1232. doi:10.1023/a:1020910305873.

Capítulo 24

Cambio climático, epidemiología vegetal y control biológico de fitopatógenos

Chapter 24

Climate change, plant epidemiology and biological control of plant pathogens

John Fredy Hernández Nopsa[1]

[1] Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA)

Contenido

Introducción 1018

Enfermedades de plantas y cambio climático 1020

Control biológico y cambio climático: ¿Qué podría suceder? 1024

Modelos, cambio climático, enfermedades y control biológico 1025

Controladores biológicos y cambio climático 1027

Cambio climático y micotoxinas 1028

Conclusiones y perspectivas 1029

Referencias 1030

Resumen

Los sistemas agrícolas se comportan y tienen características de sistemas complejos. Como sistema complejo, las respuestas a efectos y cambios que lo afecten pueden, en unos casos, ser evidentes y, en otros, enmascararse o permanecer ocultos en el sistema. El cambio climático afecta directamente múltiples sistemas en la tierra, entre ellos, los agrícolas. Se pronostica que el cambio climático causará varios efectos —positivos, negativos y neutros— en la agricultura. El control biológico, como estrategia fundamental para el manejo de plagas y enfermedades en la agricultura, puede sufrir alteraciones inesperadas como consecuencia del cambio climático. Debemos estar preparados y enfrentar problemas complejos con soluciones inteligentes, educadas e integradas, para así mitigar al máximo las consecuencias negativas del cambio climático, aprovechando las herramientas científicas y tecnológicas que tenemos hoy, tales como la epidemiología y el modelaje (en el que se encuentran los modelos de redes), para afrontar tanto las consecuencias evidentes del cambio climático en la agricultura como las que no lo son.

Palabras clave

Cambio climático, control biológico, enfermedades de plantas, epidemiología, modelos de redes, modelos epidemiológicos, sistemas complejos

Abstract

Agricultural Systems contain elements and properties —and behave as well— as Complex Systems. As a Complex System, the system response to effects and changes can be obvious in some cases or could be hidden in the system. Climate Change affects directly many, if not all systems on Earth, among those the agricultural one. Positive, negative or neutral effects could affect agricultural systems and change its outputs as a consequence of Climate Change. Biological control remains as a key strategy to Integrated Pest Management in agriculture. However, Climate Change can affect biocontrol strategies, generating unexpected and perhaps notorious consequences. The scientific community should be prepared to tackle the complex challenges that Climate Change is generating. We should come up with educated and multidisciplinary solutions to mitigate the consequences of Climate Change, combining our scientific knowledge and all scientific and technological tools available to pursue this goal. Among these tools, epidemiology, modeling, network models, among others, are key to develop strategies towards the adaptation to Climate Change and its concealed consequences in agricultural systems.

Keywords

Biological control, climate change, complex systems, epidemiology, modeling, network models, plant diseases

Introducción

La gran variedad de elementos que componen los sistemas agrícolas hace que estos se comporten como sistemas complejos. Dicha variedad de componentes —bióticos, abióticos, sociales y económicos—, así como las propiedades y características derivadas de las interacciones entre estos, generan 'propiedades emergentes' y características aún más complejas que las de cada componente por separado. La complejidad es una propiedad innata dentro de los componentes de varios sistemas (Meadows, 2008), incluyendo, por supuesto, los agrícolas (figuras 24.1 y 24.2).

Algunos de los componentes de los sistemas agrícolas, como las enfermedades y los insectos plaga que afectan los cultivos, poseen *per se* altos niveles de complejidad. Por ejemplo, la relación hospedero-planta-patógeno y el clima (pilares para procesos de infección de patógenos en plantas y desarrollo de epidemias) son una clara muestra de ello. Por tal razón, es apropiado analizar el desarrollo de enfermedades y epidemias en sistemas agrícolas, así como su manejo y control desde la óptica dada por los sistemas complejos.

Foto: John Fredy Hernández Nopsa

Figura 24.1. Sistema agrícola de producción de semilla de papa en los Andes colombianos. Los sistemas agrícolas poseen características típicas de sistemas complejos, en donde las interacciones entre sus diversos elementos, como clima, comunidades humanas, plantas, semillas, patógenos, plagas y ambiente, generan propiedades emergentes, típicas de un sistema complejo.

Foto: John Fredy Hernández Nopsa

Figura 24.2. Sistema de producción de papa completamente cubierto por ceniza volcánica en Tungurahua, Ecuador. La erupción del volcán Tungurahua, en noviembre del 2015, afectó todos los sistemas productivos de la región. Se espera que eventos como este sean de mayor intensidad y más frecuentes gracias al efecto del cambio climático.

El cambio climático —entendido como los cambios rápidos en el clima, debidos a la expedita liberación de gases de invernadero causantes del incremento de la temperatura promedio en la tierra y de otros problemas como la acidificación de los océanos, la alteración de los patrones del tiempo y cambios en agricultura y ecología (Zefferman, 2017)— es causado por la actividad humana y genera temibles amenazas para la vida en la tierra (Hodson, 2017). Consecuentemente, el cambio climático es de vital importancia para la agricultura por los efectos directos en los sistemas agrícolas y por las interacciones que genera con otros componentes de estos (*v. g.*, bióticos, abióticos, sociales y económicos, entre otros). El reto generado por el cambio climático en la agricultura, al variar y alterar patrones de diversas variables (*i. e.*, temperatura, humedad, rocío, precipitación y circulación del viento), es el de entender estas variables climáticas y sus interacciones con los agrosistemas, para generar óptimos desarrollos en los sistemas agrícolas y alcanzar excelsos niveles de producción. Este reto se debe asumir no solo a nivel nacional y regional, como se ha venido haciendo en algunos países, sino a nivel global (Garrett, Thomas-Sharma, Forbes, & Hernández Nopsa, 2014; Helfer, 2014; Lesk, Rowhani & Ramankutty, 2016; Rosenzweig & Parry, 1994; Ruane, Winter, McDermid, & Hudson, 2015).

Es fundamental para los procesos de adaptación de la agricultura al cambio climático entender tanto sus efectos directos en los procesos agrícolas (*v. g.*, producción, fertilización, uso de riego, sequías, inundaciones) como los indirectos, así como la

variación de los precios de los productos agrícolas (Calzadilla et al., 2013; Lesk et al., 2016), el deterioro en la calidad de vida y caídas de producto interno bruto, entre otros. De igual manera, es clave estudiar los efectos del cambio climático en patógenos, insectos plaga y epidemias, así como los efectos que estos puedan causar en los diferentes agrosistemas global, regional y localmente. Un elemento que juega un papel crucial en el desarrollo de epidemias es el clima, ya que cumple una función fundamental en el desarrollo de enfermedades y en la dispersión del inóculo, impidiendo (o facilitando) el desarrollo de nuevas epidemias (Agrios, 2005; Hernández Nopsa, Thomas-Sharma, & Garrett, 2014).

Enfermedades de plantas y cambio climático

Los efectos del cambio climático en la dispersión de enfermedades son generalmente ignorados al realizar análisis de riesgos de enfermedades de cultivos agrícolas (Skelsey, Cooke, Lynott, & Lees, 2016). Los cultivos (hospederos) pueden ser infectados por patógenos, disminuyendo la calidad, la producción y los rendimientos de los productos cosechados. Varios mecanismos de dispersión —viento, lluvia, vectores, transporte, maquinaria, transmisión vía semilla, entre otros— le facilitan al patógeno su llegada al hospedero apropiado, dependiendo siempre de múltiples factores como el tipo de patógeno, su ecología y su biología (Buddenhagen et al., 2017; Cunniffe et al., 2015; Hernández Nopsa et al., 2015; Madden, Hughes & Van den Bosh, 2007).

El detrimento que un patógeno causa a su hospedero bajo determinadas condiciones ambientales y a través del tiempo es conocido como 'enfermedad' (Dixon, 2012). La variabilidad existente en la incidencia, severidad y prevalencia de las enfermedades está dada por las variaciones del patógeno (diversidad en virulencia y agresividad), del hospedero (variedades de un hospedero con diversos niveles de resistencia a determinados patógenos) y por la variación de todos los factores climáticos que se encuentran en el ambiente. Estos factores pueden afectar positiva, negativa o neutralmente a todo el patosistema, gracias al efecto en las interacciones de cada uno de los elementos: hospedero, patógeno, clima y tiempo (Hernández Nopsa et al., 2014).

El cambio climático ha generado un desplazamiento de las zonas agroclimáticas hacia los polos, que podría generar condiciones óptimas para la emergencia y el desarrollo de enfermedades en nuevas regiones y la reemergencia en otras. Igualmente, el cambio climático generará una mayor variabilidad climática y una mayor frecuencia de eventos climáticos extremos de mayor severidad como temperaturas extremas (altas y bajas), lluvias torrenciales y sequías, con sus correspondientes consecuencias (inundaciones, ondas de calor, etc.), como se ilustra en la figura 24.3 (Lesk et al., 2016; Mirza, 2003; Peterson et al., 2013; Rosenzweig, Iglesias, Yang, Epstein, & Chivian, 2001; Vose et al., 2014).

Los efectos directos del cambio climático en la agricultura dependerán del tipo de cultivo, de la distribución geográfica y de la vegetación nativa. Una amplia y bien documentada revisión de la literatura sobre los efectos del cambio climático en agricultura, enfermedades de plantas, y fisiología, entre otros, ha sido presentada por Coakley, Scherm y Chakraborty (1999). Por ejemplo, temperaturas altas pueden 'quebrar' la resistencia de algunos cultivos a ciertos patógenos y afectar también la dinámica de vectores de enfermedades; por ende, pueden afectar la distribución de patógenos, incrementar estrés en las plantas y afectar la fisiología de vectores (Garrett et al., 2017; Garrett, Dendy, Frank, Rouse, & Travers, 2006; Jones & Barbetti, 2012).

De igual manera, los cambios en los patrones de precipitación (incrementos o disminuciones de las frecuencias y volúmenes de aguas lluvias) pueden alterar la ocurrencia y la frecuencia de epidemias. Por ejemplo, regiones semiáridas pueden presentar disminución de bacterias que no son transmitidas por vectores, o períodos más largos de época seca pueden incrementar la presencia de vectores (*i. e., Bemisia tabaci*) con el respectivo incremento de begomovirus (Jones & Barbetti, 2012). Asimismo, se prevé que el cambio climático incrementará la severidad de

la fusariosis de la espiga del trigo ('Fusarium head blight' o FHB; figura 24.4), cuyo aumento generará una priorización de las estrategias de manejo de dicha enfermedad en el Reino Unido (Madgwick et al., 2011), así como en la China (Zhang et al., 2014). En otro estudio, bajo diferentes escenarios de cambio climático y el efecto de FHB, se sugiere que el manejo de esta enfermedad no debe ser considerado prioritario en algunas regiones del Reino Unido (Skelsey & Newton, 2015).

Foto: John Fredy Hernández Nopsa

Figura 24.3. Vientos fuertes generando una tormenta de arena sobre el Suroeste de los Estados Unidos en agosto del 2015. Se aprecia desde el aire la magnitud de este evento extremo, afectando la región y causando consecuencias directas sobre los sistemas agrícolas.

Foto: John Fredy Hernández Nopsa

Figura 24.4. Síntomas típicos de la fusariosis de la espiga del trigo o FHB. La parte media superior de la espiga se encuentra blanca, decolorada, mostrando una falsa maduración. Esta decoloración ocurre antes del proceso fisiológico de maduración de la espiga. La parte media inferior se encuentra completamente sana. Esta sintomatología se presenta porque solo las flores de la parte media superior fueron infectadas por el hongo, mientras que las flores de la parte media inferior no lo fueron.

Entre 1997 y el 2012, la producción de trigo en los EE. UU. estuvo afectada por varias epidemias de FHB (figura 24.5), todas ellas con consecuencias económicas y sociales serísimas. Más recientemente, en el período comprendido entre el 2007 y el 2010, el Medio Oeste norteamericano —y particularmente el estado de Nebraska—, sufrió devastadoras epidemias de FHB, probablemente las peores en los últimos 22 años (Hernández Nopsa et al., 2014; McMullen et al., 2012; Wegulo, Baenziger, Hernández Nopsa, Bockus, & Hallen-Adams, 2015; Wegulo et al., 2011). Durante este periodo, existió una variación en la prevalencia (porcentaje de lotes afectados), incidencia (porcentaje de espigas afectadas) y severidad (porcentaje de espiguillas afectadas) de FHB, con predominancia muy alta de la enfermedad en el estado de Nebraska (Panthi, Hallen-Adams, Wegulo, Hernández Nopsa, & Baenziger, 2014). Durante las epidemias del 2007 y 2008, cuando los niveles de la enfermedad alcanzaron su máxima expresión, estos picos fueron explicados por los patrones de lluvia y humedad relativa altos en dichos años. De igual manera, las respuestas de variedades de trigo parcialmente resistentes a FHB fueron diferentes durante esta epidemia, acumulando mayores niveles de micotoxinas (Deoxynivalenol o DON) que variedades susceptibles (Hernández Nopsa et al., 2012).

Al mirar la distribución de la FHB en Nebraska durante la epidemia del 2007 al 2010, los niveles de severidad e incidencia de la enfermedad fueron más intensos en el 2007 y el 2008 en la zona centro-oriental del estado, lo que concuerda con los patrones históricos de precipitación, ya que esta zona ha presentado

en los últimos treinta años altos promedios de precipitación. Por otra parte, en el 2009, la severidad de FHB fue mayor en la zona suroccidental del estado, históricamente más seca, pero que en dicho año presentó niveles de precipitación más altos que los promedios históricos. Las diferencias en intensidad y ubicación de las epidemias pueden ser explicadas por la variación del régimen de lluvias que se dieron en el estado durante ese período. Existe evidencia de que el cambio climático y la variabilidad climática (por ejemplo, variaciones de fenómenos como El Niño o La Niña) están asociados con una mayor o menor frecuencia e intensidad de FHB (Kriss, Paul, & Madden, 2011; Wegulo et al., 2015).

Foto: John Fredy Hernández Nopsa

Figura 24.5. Campo de trigo con los síntomas típicos de la fusariosis de la espiga del trigo o FHB, durante la epidemia ocurrida en el estado de Nebraska, EE. UU., entre el 2007 y el 2010. Las espigas con los síntomas típicos de la enfermedad se observan blanqueadas, aparentemente maduras, y ubicadas aleatoriamente en el campo junto a espigas sanas, que no fueron infectadas por el hongo.

Diversos modelos proyectan panoramas diferentes para distintas enfermedades. Por ejemplo, pueden existir efectos que incrementen o que disminuyan la incidencia de gota de la papa (causada por *Phytophthora infestans*), dependiendo de la estación de siembra (Skelsey et al., 2016). Además, Aguayo, Elegbede, Husson, Saintonge y Marcais (2014) afirman que, con base en un modelo SIS (Susceptible-Infectado-Susceptible), el cambio climático puede incrementar o disminuir la severidad de *Phytophthora alni* en diversas regiones de Europa y, por consiguiente, su efecto en el declive de las poblaciones europeas de alisos variará dependiendo del área geográfica seleccionada.

La creciente demanda de alimentos para las generaciones presentes y futuras requiere —casi que obliga— a una continua adaptación a los efectos

causados por las enfermedades que afectan cultivos (figura 24.6), así como a enfermedades emergentes, reemergentes y, por supuesto, al cambio climático (Garrett et al., 2014; Hernández Nopsa et al., 2015; Moore & Lobell, 2014). Asimismo, se requiere que los generadores de políticas cuenten con información sólida y con base en evidencia científica para desarrollar y fortalecer una política efectiva de manejo y adaptación al cambio climático, que debe incluir desarrollo en infraestructura, manejo integrado, uso de seguros agrícolas y una evaluación de la vulnerabilidad del sistema ante eventos de clima extremo y variabilidad climática (Lesk et al., 2016), así como estrategias de adaptación, vigilancia, monitoreo, muestreo y control de enfermedades, de insectos plaga y de micotoxinas (Hernández Nopsa et al., 2015; Thomas-Sharma et al., 2017).

Foto: John Fredy Hernández Nopsa

Figura 24.6. Cultivo de papa en los Andes ecuatorianos con síntomas de virus. Se espera que enfermedades transmitidas por vectores, como los virus, sean afectadas por el cambio climático gracias a su efecto en hospederos y vectores.

Control biológico y cambio climático: ¿Qué podría suceder?

Algunos procesos biológicos pueden incrementarse, acelerarse o desacelerarse como consecuencia del cambio climático. Por ejemplo, las extinciones de diferentes grupos taxonómicos, como consecuencia directa del cambio climático, han sido numerosas, aunque su porcentaje varía de acuerdo con la región geográfica. En Suramérica, Australia y Nueva Zelanda, el porcentaje de extinción oscila entre un 14 % y 23 % (porcentajes relativamente altos), mientras que para Europa y Norteamérica se prevé un

rango menor, con niveles del 5 % al 6 % (porcentajes relativamente bajos). Las estimaciones de estos riesgos de extinción aumentan con el incremento de temperatura, afectando todos los grupos taxonómicos, y se prevé que aumentarán con el tiempo (Pacifici et al., 2015; Urban, 2015). Esta afirmación es muy importante y debe considerarse específicamente para la agricultura, ya que poblaciones de insectos y otros organismos que actúan como biocontroladores están igualmente expuestos al riesgo de extinción generado por el cambio climático, situación que conllevaría consecuencias nefastas para la agricultura. Los efectos del cambio climático alteran directamente la biología, la ecología y la epidemiología de los insectos plaga y de los fitopatógenos, y de igual forma afectan a los biocontroladores empleados en los sistemas agrícolas para controlarlos. Los efectos del cambio climático sobre los biocontroladores son hasta el momento desconocidos, y se requiere más financiación, recursos e interés por parte del público en general, así como de legisladores y académicos para entender, analizar y generar estrategias para esta problemática.

A pesar de los esfuerzos realizados hasta la fecha, se requiere de más investigación en ciencias —tanto sociales como puras—, y específicamente en cambio climático. El comportamiento de los agricultores, la adaptación al cambio y los estudios basados en la diferencia de género, entre otros, son elementos claves a los que se les debe dar más importancia en investigación (Davidson, 2016). Adicionalmente, estudios relacionados con los efectos del cambio climático en el control biológico son necesarios. Junto a estas acciones, que deben darse prontamente, es urgente generar una comunicación estratégica más efectiva y quizás de forma más 'irresistible' y menos 'estadística o abstracta' acerca del cambio climático, de sus efectos, consecuencias y formas de adaptación, ya que la complejidad del cambio climático, así como su naturaleza y posibles soluciones, son difíciles de entender, no solo para el común de las gentes, sino aún para expertos (Bushell, Colley, & Workman, 2015). Por supuesto, el control biológico y su relación con el cambio climático son también parte de esta complejidad y requieren la misma atención y enfoque.

El cambio climático es un problema de magnitud y complejidad sin comparación, al que nosotros como humanidad nos enfrentamos por primera vez. Simultáneamente, este reto nos ofrece oportunidades únicas. Todas las partes interesadas (gobiernos, público en general, ONG, universidades, empresas, políticos y otros sectores tanto públicos como privados) deben estar involucradas en la creación de esta narrativa en forma de documento para afrontar el cambio climático, que debe ser estratégica y adaptarse constantemente a los retos de este fenómeno (Bushell et al., 2015). Esta narrativa debe inspirar y empoderar acciones contundentes de manejo y adaptación al cambio climático; debe explicar la necesidad de cambios positivos e, igualmente, debe coordinar a todos los actores fundamentales y a los legisladores a promulgar leyes, legitimar acciones y persuadir las audiencias necesarias, con el fin de reducir la inacción frente a este problema. En definitiva, científicos y legisladores debemos priorizar el desarrollo de formas de comunicación sobre este tema (Bushell et al., 2015).

Modelos, cambio climático, enfermedades y control biológico

Algunos modelos han logrado dar luces sobre los efectos del cambio climático, no solo a nivel agrícola, sino también en áreas como la ecología, agroecología, control y manejo de enfermedades, y distribución de especies (Bolker et al., 2009; Clark, 2007; Logan & Wolesensky, 2009). Intento acá mostrar un panorama al respecto y, de igual forma, mostrar algunas herramientas con las que se cuenta para entender, estudiar y afrontar la situación que se avecina en términos del cambio climático.

Los modelos epidemiológicos deben incluir métodos de muestreo —y mejorar los existentes— para la detección de patógenos introducidos, emergentes y reemergentes. De la misma forma, los modelos deben servir como herramientas para resolver preguntas

como: ¿cuáles son los niveles de incidencia que una epidemia puede llegar a tener una vez detectada? o ¿cómo y dónde pueden ubicarse los recursos de la manera más efectiva en el tiempo para controlar una epidemia? (Brasier, 2008; Cunniffe et al., 2015). Dentro de los múltiples retos que tienen los modeladores y epidemiólogos está la identificación de las dinámicas de patógenos y sus hospederos en hábitats tradicionales, así como en 'nuevos hábitats', siendo estos retos claves para el entendimiento de las epidemias.

La elaboración de modelos más realistas debe incluir variables ambientales y antropogénicas, cambios temporales de la disponibilidad del hospedero, tanto a nivel poblacional como individual, y el uso de las 'redes' de transporte para la dispersión de patógenos, entre otros (Cunniffe et al., 2015). Adicionalmente, el modelamiento debe ofrecer alternativas y dar luces para el manejo, monitoreo y control de enfermedades, esto es, bajo el escenario del cambio climático se debe identificar nuevas áreas de cobertura de insectos plaga y enfermedades existentes en la zona, así como aquellos que, estando ausentes, podrían potencialmente invadir dichas áreas bajo nuevos escenarios climáticos (Garrett et al., 2017; Thomas-Sharma et al., 2017). Asimismo, se deben identificar áreas en las que los controladores biológicos puedan actuar y ejercer su función. El objetivo último de los modelos es el de entender el sistema para poder predecirlo (Clark, 2007). Por ende, los modelos epidemiológicos deben ayudar al entendimiento de la complejidad de los sistemas agrícolas y de los patosistemas para así proponer soluciones prácticas a problemáticas que aquejan a los agricultores, incluidas las generadas por el cambio climático.

El cambio climático ha generado otro gigantesco reto en el sector agrícola. Las fluctuaciones generadas en temperatura, humedad, precipitación y patrones de circulación por el Cambio Climático hacen que el entendimiento de las condiciones climáticas en las que los cultivos se desarrollan sea más complejo, no solo a nivel nacional, sino a niveles regional y global (Garrett et al., 2014; Lesk et al., 2016; Rosenzweig & Parry, 1994; Ruane et al., 2015). Esta complejidad genera enormes incertidumbres acerca de las consecuencias y efectos (positivos, negativos o neutros) del cambio climático en el desarrollo de enfermedades y de epidemias en diferentes patosistemas (Boland, Melzer, Hopkin, Higgins, & Nassuth, 2004; Helfer, 2014; Luck et al., 2011). Rosenzweig y Parry (1994) mostraron que los efectos negativos del cambio climático en la agricultura serán más fuertes en países en vía de desarrollo, siendo estos países además los más vulnerables a dichos riesgos. Además, algunos autores sugieren que el cambio climático puede afectar positivamente agricultores europeos siempre y cuando se adapten a este fenómeno, o de lo contrario serán afectados negativamente (Frost, Groves & Charkowski, 2013).

Los análisis de redes o 'Network Analysis' han sido empleados ampliamente en diferentes áreas del conocimiento, entre ellas la epidemiología humana y animal, la conservación, la ecología y la fitopatología (Chadès et al., 2011; Cox, Bockus, Holt, Fang, & Garrett, 2013; Margosian, Garrett, Hutchinson & With, 2009; May, 2005, 2006; Pautasso & Jeger, 2014; Sutrave, Scoglio, Isard, Hutchinson & Garrett, 2012). Con la ayuda de herramientas como los modelos de redes o 'Network Models' se puede abordar el estudio de la complejidad de los sistemas agrícolas, para desentrañar algunas de las características ocultas de estos sistemas. Igualmente, los modelos de redes identificando propiedades tales como la conectividad y aplicados a patosistemas y metapoblaciones, permiten predecir y rastrear posibles rutas de movimiento de epidemias y sus orígenes, así como dar luces sobre manejos más acertados de epidemias de acuerdo con las características y métricas de las redes (Hernández Nopsa et al., 2015). De la misma forma, con otros tipos de modelos se podría disminuir los niveles de incertidumbre, y se tendría más información para la toma de decisiones para el manejo, prevención y control de epidemias. Asimismo, estos modelos ayudarían a generar estrategias para una mejor adaptación al cambio climático y a sus consecuencias.

Los modelos de redes y el estudio de las interacciones entre los componentes de los patosistemas han permitido proponer diferentes estrategias de manejo, monitoreo y control de plagas y enfermedades (Hernández Nopsa et al., 2015; Pautasso & Jeger, 2014; Shaw & Pautasso, 2014), como por ejemplo en enfermedades de plantas transmitidas por semilla asexual (Buddenhagen et al., 2017), o en enfermedades, insectos plaga y micotoxinas transmitidas o movilizadas en granos almacenados

(Hernández Nopsa et al., 2015; Wu & Guclu, 2012, 2013). Las redes y sus interacciones permiten identificar nodos críticos para la dispersión de enfermedades y plagas o nodos más susceptibles o que tengan mayor probabilidad de sufrir los efectos negativos del cambio climático. Así, se podrían establecer estrategias para el manejo, prevención y adaptación al cambio climático para dichos nodos.

Controladores biológicos y cambio climático

Se proyecta que el cambio climático afectará la epidemiología de las enfermedades y la dinámica poblacional de insectos plaga, y consecuentemente el manejo integrado de patógenos y plagas en términos de tiempo, efectividad, preferencia de hospedero y eficacia. Sin embargo, poco se conoce de los efectos potenciales del cambio climático específicamente en los métodos de control biológico (Ghini, Hamada, & Bettiol, 2008; Juroszek & Von Tiedemann, 2011).

El manejo de enfermedades y plagas debe ajustarse a los cambios generados por el cambio climático, ya que se presume que la vulnerabilidad de los controladores biológicos será mayor en la medida que la variabilidad del clima se incremente. La efectividad de los controladores está probada bajo ciertas condiciones ambientales muy específicas. Cambios en temperatura y humedad podrían generar alteraciones a las poblaciones de controladores y sus dinámicas (Garrett et al., 2006; Juroszek & Von Tiedemann, 2011).

Adicionalmente, es importante tener en cuenta conceptos como el 'escape de la enfermedad' (Agrios, 2005), en el que áreas dejan de ser libres de enfermedades por el advenimiento de patógenos provenientes de zonas con la enfermedad. El 'escape de enfermedades' podría verse favorecido por el cambio climático, ya que áreas libres podrían adquirir condiciones ambientales favorables a plagas y patógenos y, por tanto, ser receptoras de estos, perdiendo su condición de áreas libres. Simultáneamente, procesos como el de 'saturación' y 'difusión' de patógenos y enfermedades (Xing et al., 2017) se vería influenciados (y quizás incrementados) por el cambio climático.

Gerard et al. (2013) señalan que los estudios de cambio climático y sus efectos en plagas y enfermedades en su mayoría apuntan al efecto sobre especies individuales, mientras que los efectos del cambio climático en el control biológico se dan en múltiples niveles, involucrando sistemas y las interacciones entre estos a diferentes niveles tróficos y no en especies individuales.

El planteamiento realizado por dichos autores es que se deben considerar seis retos causados por el cambio climático en control biológico, que se presentan a continuación:

- Cambios en la distribución de especies gracias al cambio climático y sus efectos en las distribuciones de plagas y de sus controladores. En términos de distribución de especies, se espera que las plagas y sus biocontroladores se muevan siguiendo el mismo patrón de las plantas hospederas, ya que este movimiento es un proceso gradual.
- Tiempos de hibernación más cortos y épocas de cosechas más largas. El tiempo requerido por ciertas especies de biocontroladores para adaptarse a una nueva región puede verse afectado por la capacidad nutricional de estas zonas para los biocontroladores y por las zonas de refugios invernales o de hibernación y de estivación.
- Impactos en los blancos específicos de los biocontroladores, que podrían cambiar.
- Variabilidad climática y eventos extremos del clima, ya que afectarían de manera más drástica a los biocontroladores que a las poblaciones a controlar.
- Alteración de la sincronía entre el biocontrolador y su especie blanco.
- Efectividad de los biocontroladores, ya que puede variar con el cambio climático.

De igual forma, se afirma que estos efectos van a depender de las condiciones geográficas y de las condiciones ambientales que rijan el área —islas, áreas continentales, etcétera— (Gerard et al., 2013). Como solución a los efectos del cambio climático en biocontroladores, Ghini et al. (2008) plantean que los esfuerzos de generación de controladores biológicos deben apuntar a la creación de controladores más tolerantes a la variabilidad climática.

Cambio climático y micotoxinas

Las micotoxinas, contaminantes de granos, son metabolitos secundarios producidos por hongos durante el proceso de producción de semillas y granos en campo o mientras se encuentran almacenados. Las micotoxinas afectan drásticamente múltiples cultivos mundialmente, en diferentes latitudes y altitudes, con efectos negativos directos en la salud pública y que alteran negativamente el bienestar económico y social de las regiones afligidas.

Las variables que contribuyen directamente al incremento de poblaciones fúngicas y la consecuente presencia de micotoxinas en productos y subproductos agrícolas son el aumento de temperatura, el estrés de las plantas causado por sequías, el exceso de humedad y las lluvias (Bandyopadhyay et al., 2016; Hernández Nopsa et al., 2015; Petzinger & Weidenbach, 2002; Pitt, 2000; Wegulo, 2012; Wu, 2015; Wu et al., 2011). El transporte global de granos almacenados y su comercio internacional incrementan el riesgo de dispersión de micotoxinas mundialmente (Wu & Guclu, 2012).

Las aflatoxinas —producidas principalmente por *Aspergillus flavus*, aunque otras especies del mismo género también pueden producirlas— son altamente cancerígenas; el consumo de granos contaminados produce enfermedades como la cirrosis hepática y afecta el desarrollo normal del crecimiento infantil. De igual forma, granos y productos contaminados con aflatoxinas limitan seriamente los mercados locales, regionales e internacionales. El cambio climático y la variabilidad climática podrían generar que los niveles de micotoxinas en precosecha se incrementen gracias a sequías prolongadas y altas temperaturas. Adicionalmente, estas condiciones climáticas harían que la producción y dispersión de conidios sean mayores, incrementando las áreas afectadas por este problema.

Los patrones de clima variable pueden afectar los ciclos de vida de los hongos, así como la producción de micotoxinas en varias especies de ellos, entre los que se encuentra *Fusarium* spp. Es importante considerar que los efectos del cambio climático podrían ser diferentes para cada una de las especies productoras de micotoxinas (Bandyopadhyay et al., 2016; Wu et al., 2011) y variarían de acuerdo con las condiciones climáticas. La infección del hongo y su consecuente producción de aflatoxinas (para el caso de *A. flavus*) puede iniciarse en el campo y seguir durante el almacenamiento, o producirse directamente en el almacenamiento o en poscosecha. Una de las estrategias para el manejo de la contaminación con micotoxinas consiste en la eliminación de los granos contaminados. Infortunadamente, esta labor no es completamente efectiva o simplemente no se lleva a cabo, especialmente en países en desarrollo.

Los granos contaminados muchas veces terminan siendo consumidos por los propios agricultores, que lo hacen por desconocimiento de los efectos de las micotoxinas, mientras que los granos no contaminados son vendidos; una de las causas para que esto ocurra es que no existe otra fuente de alimento para dichos agricultores. Actualmente, la única estrategia comercialmente efectiva para el manejo de este problema es el uso de aislamientos atoxigénicos de *A. flavus*, usado como biocontrolador (Bandyopadhyay et al., 2016).

Las bioformulaciones de estas cepas atoxigénicas ofrecen ventajas reproductivas y de dispersión sobre las cepas toxigénicas. Las cepas atoxigénicas producen poblaciones que colonizan al hospedero e impiden —o desplazan— la colonización por cepas toxigénicas del hospedero, convirtiéndose de esta forma en piezas clave para el control de contaminación de productos por micotoxinas.

El cambio climático puede jugar un papel muy importante en el uso de esta tecnología para el control de *A. flavus*, ya que puede afectar los procesos de dispersión de cepas atoxigénicas y la adaptación de las poblaciones de las cepas atoxigénicas frente a las toxigénicas. Las cepas atoxigénicas necesitan esporular en épocas de lluvia, para así generar la cobertura del área deseada. Si el cambio climático afecta los patrones de lluvia, la efectividad de este método de control se verá comprometida, aunque existen, en todo caso, otras cepas que pueden actuar muy bien bajo condiciones secas y calientes (Bandyopadhyay et al., 2016; Wu et al., 2011).

Conclusiones y perspectivas

El cambio climático puede tener tres tipos de efectos o consecuencias en la agricultura, y específicamente en la biología, ecología y uso de controladores biológicos. Estos pueden ser negativos, positivos o neutros. Se espera que estos efectos varíen de acuerdo con el sistema agrícola, los problemas sanitarios involucrados y la región. Es claro que, como sistema complejo, el cambio climático traerá problemas complejos al sistema agrícola; problemas complejos requieren soluciones multidisciplinarias, no enfoques unidisciplinarios.

Las soluciones deben ser integrales, siendo fundamental mejorar las estrategias de manejo integrado de plagas para hacerlas más eficientes y efectivas (Howden et al., 2007). Debemos estar preparados para afrontar estos retos, con las herramientas que tenemos hoy en día, como los modelos epidemiológicos, modelos de redes y demás ayudas, para adaptarnos y mitigar los efectos del cambio climático en la agricultura.

Referencias

Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. Nueva York, EE. UU.: Elsevier Science.

Aguayo, J., Elegbede, F., Husson, C., Saintonge, F.-X., & Marcais, B. (2014). Modeling climate impact on an emerging disease, the *Phytophthora alni*-induced alder decline. *Global Change Biology*, *20*(10), 3209-3221. doi:10.1111/gcb.12601.

Bandyopadhyay, R., Ortega-Beltran, A., Akande, A., Mutegi, C., Atehnkeng, J., Kaptoge, L., ... Cotty, P. J. (2016). Biological control of aflatoxins in Africa: Current status and potential challenges in the face of Climate Change. *World Mycotoxin Journal*, *9*(5), 771-789. doi:10.3920/wmj2016.2130.

Boland, G. J., Melzer, M. S., Hopkin, A., Higgins, V., & Nassuth, A. (2004). Climate Change and plant diseases in Ontario. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie*, *26*(3), 335-350. doi:10.1080/07060660409507151.

Bolker, B. M., Brooks, M. E., Clark, C. J., Geange, S. W., Poulsen, J. R., Stevens, M. H. H., & White, J.-S. S. (2009). Generalized linear mixed models: A practical guide for ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, *24*(3), 127-135. doi:10.1016/j.tree.2008.10.008.

Brasier, C. M. (2008). The biosecurity threat to the UK and global environment from international trade in plants. *Plant Pathology*, *57*(5), 792-808. doi:10.1111/j.1365-3059.2008.01886.x.

Buddenhagen, C. E., Hernández Nopsa, J. F., Andersen, K. F., Andrade-Piedra, J., Forbes, G. A., Kromann, P., ... Garrett, K. A. (2017). Epidemic network analysis for mitigation of invasive pathogens in seed systems: Potato in Ecuador. *Phytopathology*, *107*(10), 1209-1218. doi:10.1094/PHYTO-03-17-0108-FI.

Bushell, S., Colley, T., & Workman, M. (2015). A unified narrative for Climate Change. *Nature Climate Change*, *5*(11), 971-973. doi:10.1038/nclimate2726.

Calzadilla, A., Rehdanz, K., Betts, R., Falloon, P., Wiltshire, A., & Tol, R. S. J. (2013). Climate Change impacts on global agriculture. *Climatic Change*, *120*(1-2), 357-374. doi:10.1007/s10584-013-0822-4.

Chadès, I., Martin, T. G., Nicol, S., Burgman, M. A., Possingham, H. P., & Buckley, Y. M. (2011). General rules for managing and surveying networks of pests, diseases, and endangered species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(20), 8323-8328. doi:10.1073/pnas.1016846108.

Clark, J. S. (2007). *Models for ecological data: An introduction*. Nueva Jersey, EE. UU.: Princeton University Press.

Coakley, S. M., Scherm, H., & Chakraborty, S. (1999). Climate Change and plant disease management. *Annual Review of Phytopathology*, *37*, 399-426. doi:10.1146/annurev.phyto.37.1.399.

Cox, C. M., Bockus, W. W., Holt, R. D., Fang, L., & Garrett, K. A. (2013). Spatial connectedness of plant species: Potential links for apparent competition via plant diseases. *Plant Pathology*, *62*(6), 1195-1204. doi:10.1111/ppa.12045.

Cunniffe, N. J., Koskella, B., E. Metcalf, C. J., Parnell, S., Gottwald, T. R., & Gilligan, C. A. (2015). Thirteen challenges in modelling plant diseases. *Epidemics*, *10*, 6-10. doi:10.1016/j.epidem.2014.06.002.

Davidson, D. (2016). Gaps in agricultural climate adaptation research. *Nature Climate Change*, *6*(5), 433-435. doi:10.1038/nclimate3007.

Dixon, G. R. (2012). Climate Change – impact on crop growth and food production, and plant pathogens. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *34*(3), 362-379. doi:10.1080/07060661.2012.701233.

Frost, K. E., Groves, R. L., & Charkowski, A. O. (2013). Integrated control of potato pathogens through seed potato certification and provision of clean seed potatoes. *Plant Disease*, *97*(10), 1268-1280. doi:10.1094/pdis-05-13-0477-fe.

Garrett, K. A., Andersen, K. F., Asche, F., Bowden, R. L., Forbes, G. A., Kulakow, P. A., & Zhou, B. (2017). Resistance genes in global crop breeding networks. *Phytopathology*, *107*(10), 1268-1278. doi:10.1094/PHYTO-03-17-0082-FI.

Garrett, K. A., Dendy, S. P., Frank, E. E., Rouse, M. N., & Travers, S. E. (2006). Climate Change effects on plant

disease: Genomes to ecosystems. *Annual Review of Phytopathology*, *44*(1), 489-509. doi:10.1146/annurev.phyto.44.070505.143420.

Garrett, K. A., Thomas-Sharma, S., Forbes, G. A., & Hernández Nopsa, J. (2014). Climate Change and plant pathogen invasions. En L. H. Ziska, & J. S. Dukes (Eds.), *Invasive Species and Global Climate Change* (pp. 22-44). Wallingford, EE. UU.: Centre for Agricultural Bioscience International (CABI).

Gerard, P. J., Barringer, J. R. F., Charles, J. G., Fowler, S. V., Kean, J. M., Phillips, C. B., ... Walker, G. P. (2013). Potential effects of Climate Change on biological control systems: Case studies from New Zealand. *Biocontrol*, *58*(2), 149-162. doi:10.1007/s10526-012-9480-0.

Ghini, R., Hamada, E., & Bettiol, W. (2008). Climate Change and plant diseases. *Scientia Agricola*, *65*(N.º especial), 98-107. doi:10.1590/S0103-90162008000700015.

Helfer, S. (2014). Rust fungi and global change. *New Phytologist*, *201*(3), 770-780. doi:10.1111/nph.12570.

Hernández Nopsa, J. F., Baenziger, P. S., Eskridge, K. M., Peiris, K. H. S., Dowell, F. E., Harris, S. D., & Wegulo, S. N. (2012). Differential accumulation of deoxynivalenol in two winter wheat cultivars varying in FHB phenotype response under field conditions. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne de Phytopathologie*, *34*(3), 380-389. doi:10.1080/07060661.2012.695751.

Hernández Nopsa, J. F., Daglish, G. J., Hagstrum, D. W., Leslie, J. F., Phillips, T. W., Scoglio, C., ... Garrett, K. A. (2015). Ecological networks in stored grain: Key postharvest nodes for emerging pests, pathogens, and mycotoxins. *BioScience*, *65*(10), 985-1002. doi:10.1093/biosci/biv122.

Hernández Nopsa, J. F., Thomas-Sharma, S., & Garrett, K. A. (2014). Climate Change and Plant Disease. En N. V. Alfen (Ed.), *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems* (Vol. 2, pp. 232-243). San Diego, EE. UU.: Elsevier.

Hernández Nopsa, J. F., Wegulo, S. N., Panthi, A., Hallen-Adams, H. E., Harris, S. D., & Baenziger, P. S. (2014). Characterization of Nebraska isolates of *Fusarium graminearum* causing head blight of wheat. *Crop Science*, *54*(1), 310-317. doi:10.2135/cropsci2013.04.0229.

Hodson, R. (2017). Climate Change. *Nature*, *550*(Supl. 7675), S53. doi:10.1038/550S53a.

Howden, S. M., Soussana, J.-F., Tubiello, F. N., Chhetri, N., Dunlop, M., & Meinke, H. (2007). Adapting agriculture to Climate Change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(50), 19691-19696. doi:10.1073/pnas.0701890104.

Jones, R. A. C., & Barbetti, M. J. (2012). Influence of Climate Change on plant disease infections and epidemics caused by viruses and bacteria. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, *7*(22), 1-31. doi:10.1079/PAVSNNR20127022.

Juroszek, P., & Von Tiedemann, A. (2011). Potential strategies and future requirements for plant disease management under a changing climate. *Plant Pathology*, *60*(1), 100-112. doi:10.1111/j.1365-3059.2010.02410.x.

Kriss, A. B., Paul, P. A., & Madden, L. V. (2011). Variability in Fusarium head blight epidemics in relation to global climate fluctuations as represented by the El Niño-Southern Oscillation and other atmospheric patterns. *Phytopathology*, *102*(1), 55-64. doi:10.1094/PHYTO-04-11-0125.

Lesk, C., Rowhani, P., & Ramankutty, N. (2016). Influence of extreme weather disasters on global crop production. *Nature*, *529*(7584), 84-87. doi:10.1038/nature16467.

Logan, J. D., & Wolesensky, W. (2009). *Mathematical Methods in Biology*. Nueva Jersey, EE. UU.: Wiley.

Luck, J., Spackman, M., Freeman, A., Trebicki, P., Griffiths, W., Finlay, K., & Chakraborty, S. (2011). Climate Change and diseases of food crops. *Plant Pathology*, *60*(1), 113-121. doi:10.1111/j.1365-3059.2010.02414.x.

Madden, L. V., Hughes, G., & Van den Bosh, F. (2007). *The Study of Plant Disease Epidemics*. St. Paul, Minnesota, EE. UU.: The American Phytopathological Society.

Madgwick, J. W., West, J. S., White, R. P., Semenov, M. A., Townsend, J. A., Turner, J. A., & Fitt, B. D. L. (2011). Impacts of Climate Change on wheat anthesis and Fusarium ear blight in the UK. *European Journal of Plant Pathology*, *130*(1), 117-131. doi:10.1007/s10658-010-9739-1.

Margosian, M. L., Garrett, K. A., Hutchinson, J. M. S., & With, K. A. (2009). Connectivity of the American agricultural landscape: Assessing the national risk of crop pest and disease spread. *BioScience*, *59*(2), 141-151. doi:10.1525/bio.2009.59.2.7.

May, R. M. (2005). Infectious disease: Can we avert a lethal flu pandemic? *Current Biology*, *15*(22), R922-R924. doi:10.1016/j.cub.2005.10.063.

May, R. M. (2006). Network structure and the biology of populations. *Trends in Ecology and Evolution*, *21*(7), 394-399. doi:10.1016/j.tree.2006.03.013.

McMullen, M., Bergstrom, G., De Wolf, E., Dill-Macky, R., Hershman, D., Shaner, G., & Van Sanford, D. (2012). A Unified effort to fight an enemy of wheat and barley: Fusarium head blight. *Plant Disease*, *96*(12), 1712-1728. doi:10.1094/PDIS-03-12-0291-FE.

Meadows, D. (2008). *Thinking in Systems: A Primer*. Nueva York, EE. UU.: Chelsea Green Publishing.

Mirza, M. M. Q. (2003). Climate change and extreme weather events: can developing countries adapt? *Climate Policy*, *3*(3), 233-248. doi:10.1016/S1469-3062(03)00052-4.

Moore, F. C., & Lobell, D. B. (2014). Adaptation potential of European agriculture in response to Climate Change. *Nature Climate Change 4*(7), 610-614. doi:10.1038/nclimate2228.

Pacifici, M., Foden, W. B., Visconti, P., Watson, J. E. M., Butchart, S. H. M., Kovacs, K. M., ... Rondinini, C. (2015). Assessing species vulnerability to climate change. *Nature Climate Change, 5*(3), 215-224. doi:10.1038/nclimate2448.

Panthi, A., Hallen-Adams, H., Wegulo, S. N., Hernández Nopsa, J., & Baenziger, P. S. (2014). Chemotype and aggressiveness of isolates of *Fusarium graminearum* causing head blight of wheat in Nebraska. *Canadian Journal of Plant Pathology, 36*(4), 447-455. doi:10.1080/07060661.2014.964775.

Pautasso, M., & Jeger, M. J. (2014). Network epidemiology and plant trade networks. *AoB plants, 6*(0), plu007. doi:10.1093/aobpla/plu007.

Peterson, T. C., Jr., R. R. H., Hirsch, R., Kaiser, D. P., Brooks, H., Diffenbaugh, N. S., ... Wuebbles, D. (2013). Monitoring and understanding changes in heat waves, cold waves, floods, and droughts in the United States: State of knowledge. *Bulletin of the American Meteorological Society, 94*(6), 821-834. doi:10.1175/bams-d-12-00066.1.

Petzinger, E. & Weidenbach, A. (2002). Mycotoxins in the food chain: The role of ochratoxins. *Livestock Production Science, 76*(3), 245-250. doi:10.1016/S0301-6226(02)00124-0.

Pitt, J. I. (2000). Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin, 56*(1), 184-192. doi:10.1258/0007142001902888.

Rosenzweig, C., Iglesias, A., Yang, X., Epstein, P. R., & Chivian, E. (2001). Climate change and extreme weather events; implications for food production, plant diseases, and pests. *Global change & human health, 2*(2), 90-104.

Rosenzweig, C., & Parry, M. L. (1994). Potential impact of Climate Change on world food supply. *Nature, 367*(6459), 133-138. doi:10.1038/367133a0.

Ruane, A. C., Winter, J. M., McDermid, S. P., & Hudson, N. I. (2015). AgMIP Climate Data and Scenarios for Integrated Assessment. En A. Rosenzweig, & D. Hillel (Eds.), *Handbook of Climate Change and Agroecosystems* (pp. 45-78). Londres, Reino Unido: Imperial College Press.

Shaw, M. W., & Pautasso, M. (2014). Networks and plant disease management: Concepts and applications. *Annual Review of Phytopathology, 52*, 477-493. doi:10.1146/annurev-phyto-102313-050229.

Skelsey, P., Cooke, D. E. L., Lynott, J. S., & Lees, A. K. (2016). Crop connectivity under Climate Change: Future environmental and geographic risks of potato late blight in Scotland. *Global Change Biology, 22*(11), 3724-3738. doi:10.1111/gcb.13368.

Skelsey, P., & Newton, A. C. (2015). Future environmental and geographic risks of Fusarium head blight of wheat in Scotland. *European Journal of Plant Pathology, 142*(1), 133-147. doi:10.1007/s10658-015-0598-7.

Sutrave, S., Scoglio, C., Isard, S. A., Hutchinson, J. M. S., & Garrett, K. A. (2012). Identifying highly connected counties compensates for resource limitations when evaluating national spread of an invasive pathogen. *PLoS One, 7*(6), 1-12. doi:10.1371/journal.pone.0037793.

Thomas-Sharma, S., Andrade-Piedra, J., Carvajal Yepes, M., Hernández Nopsa, J. F., Jeger, M. J., Jones, R. A. C., ... Garrett, K. A. (2017). A Risk assessment framework for seed degeneration: Informing an integrated seed health strategy for vegetatively propagated crops. *Phytopathology*, *107*(10), 1123-1135. doi:10.1094/PHYTO-09-16-0340-R.

Urban, M. C. (2015). Accelerating extinction risk from Climate Change. *Science*, *348*(6234), 571-573. doi:10.1126/science.aaa4984.

Vose, R. S., S. Applequist, M. A. Bourassa, S. C. Pryor, R. J. Barthelmie, B. Blanton, ... Young, R. S. (2014). Monitoring and understanding changes in extremes: Extratropical storms, winds, and waves. *Bulletin of America Meteorology Society*, *95*, 377-386. doi:10.1175/BAMS-D-12-00162.1.

Wegulo, S. N. (2012). Factors influencing deoxynivalenol accumulation in small grain cereals. *Toxins*, *4*(11), 1157-1180. doi:10.3390/toxins4111157.

Wegulo, S. N., Baenziger, P. S., Hernández Nopsa, J., Bockus, W. W., & Hallen-Adams, H. (2015). Management of Fusarium head blight of wheat and barley. *Crop Protection*, *73*(0), 100-107. doi:10.1016/j.cropro.2015.02.025.

Wegulo, S. N., Bockus, W. W., Hernández Nopsa, J., De Wolf, E. D., Eskridge, K. M., Peiris, K. H. S., & Dowell, F. E. (2011). Effects of integrating cultivar resistance and fungicide application on Fusarium head blight and deoxynivalenol in winter wheat. *Plant Disease*, *95*(5), 554-560. doi:10.1094/PDIS-07-10-0495.

Wu, F. (2015). Global impacts of aflatoxin in maize: trade and human health. *World Mycotoxin Journal*, *8*(2), 137-142. doi:10.3920/wmj2014.1737.

Wu, F., Bhatnagar, D., Bui-Klimke, T., Carbone, I., Hellmich, R., Munkvold, G., ... Takle, E. (2011). Climate Change impacts on mycotoxin risks in US maize. *World Mycotoxin Journal*, *4*(1), 79-93. doi:doi:10.3920/WMJ2010.1246.

Wu, F., & Guclu, H. (2012). Aflatoxin Regulations in a Network of Global Maize Trade. *PLoS One*, *7*(9). doi:10.1371/journal.pone.0045151.

Wu, F., & Guclu, H. (2013). Global Maize Trade and Food Security: Implications from a Social Network Model. *Risk Analysis*, *33*(12), 2168-2178. doi:10.1111/risa.12064.

Xing, Y., Hernández Nopsa, J., Andrade-Piedra, J., Beed, F., Blomme, G., Carvajal Yepes, M., ... Garrett, K. A. (2017). Global cropland connectivity: A risk factor for invasion and saturation by emerging pathogens and pests. *bioRxiv*, *Article 106542*. doi:10.1101/106542.

Zefferman, M. R. (2017). Cultural multilevel selection suggests neither large or small cooperative agreements are likely to solve Climate Change without changing the game. *Sustainability Science*, *13*(1), 109-118 doi:10.1007/s11625-017-0488-3.

Zhang, X., Halder, J., White, R. P., Hughes, D. J., Ye, Z., Wang, C., ... Fitt, B. D. L. (2014). Climate change increases risk of Fusarium ear blight on wheat in central China. *Annals of Applied Biology*, *164*(3), 384-395. doi:10.1111/aab.12107.

Capítulo 25

Cambio climático y control biológico de insectos: visión y perspectiva de la situación

Chapter 25

Climate change and biological control of insects: current situation and perspectives

Guillermo León M.,[1] Ángela M. Arcila C.,[1]
Luz Astrid Pulido,[2] Takumasa Kondo[1]

[1] Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA)

[2] Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE)
Colombia

Contenido

Introducción 1038

Seguridad alimentaria, plaguicidas y cambio climático 1039

Dinámica de poblaciones de plagas y cambio climático 1041

La cochinilla acanalada de Colombia *Crypticerya multicicatrices* Kondo y Unruh (Hemiptera: Monophlebidae): una plaga favorecida por las condiciones urbanas 1041

El caso de la langosta llanera *Rhammatocerus schistocercoides* Rehn 1043

El caso de la broca del café en áreas productoras de Colombia 1044

Control biológico y enfoque hacia el cambio climático en Colombia 1047

Conclusiones y perspectivas 1051

Referencias 1052

Resumen

En este capítulo se discuten los efectos de la variabilidad del clima y el cambio climático en la producción de alimentos, la seguridad alimentaria, el uso de pesticidas, las poblaciones de insectos plaga y su control biológico en los sistemas de producción. El análisis se enfoca en los efectos de cambio climático sobre la agricultura, para lo cual se revisan ejemplos recientes y proyecciones futuras. Se presentan estudios de caso realizados con la langosta llanera, la broca del café y la cochinilla acanalada de Colombia. También se discuten algunos ejemplos de sistemas de producción agrícola sostenible en Colombia, así como los efectos que las investigaciones y la aplicación de algunos modelos han significado para la producción de alimentos inocuos en el contexto del cambio climático.

Palabras clave

Calentamiento global, Colombia, insectos plaga, seguridad alimentaria, sostenibilidad

Abstract

In this chapter we discuss the effects of climate variability and climate change on food production, food security, the use of pesticides, insect pest populations and their biological control in production systems. The analysis focuses on the effects of climate change on agriculture, looking at examples from the recent past and forecasts. Examples of research conducted on the South American migratory locust, the coffee berry borer and the Colombian fluted scale are presented as case studies. Some examples of sustainable agricultural production systems in Colombia and the effects that research and these models mean against the production of safe food in the context of climate change are presented and discussed.

Keywords

Colombia, food safety, global warming, insect pests, sustainability

Introducción

El control biológico, como se ha evidenciado en los capítulos anteriores, juega un papel importante para atender la demanda actual de alimentos sanos e inocuos, gracias a sistemas de producción sostenibles que no interfieran con el equilibrio ambiental. No obstante, las variaciones en el clima podrían modificar la eficacia de dichos sistemas de producción, puesto que afectarían la biología y los hábitats de los enemigos naturales utilizados como agentes de control de plagas. De acuerdo con el Panel Intergubernamental de Cambio Climático, la mayor amenaza medioambiental que incide en nuestro planeta actualmente es el cambio climático. Esta problemática se ha visto acelerada e inducida por sistemas de generación de energía basados en la quema de combustibles fósiles, especialmente, petróleo, carbón y gas, los cuales, además de no ser renovables, liberan gases de efecto invernadero a la atmósfera, aumentan la temperatura global del planeta y provocan distorsiones en el clima (Colombia, Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, 2018).

El Panel Intergubernamental de Cambio Climático, constituido en 1988, es una organización internacional de países miembros de las Naciones Unidas. Su principal tarea es analizar la información científica, técnica y socioeconómica relevante sobre el cambio climático. Esta organización es considerada mundialmente como el ente base para cualquier decisión que se tome sobre el calentamiento global. El Panel ha llegado a la conclusión de que el cambio climático es responsabilidad del hombre y afirma que, aunque la humanidad reduzca las concentraciones de gases efecto invernadero —como dióxido de carbono (CO_2), gas metano (CH_4) y óxido nitroso (N_2O), además de gases industriales fluorados como hidrofluorocarbonos (HFC), perfluorocarbonos (PFC) y hexafluoruro de azufre (SF_6) (Universidad del Rosario, s. f.)—, lo más probable es que ocurra un calentamiento global cercano a los 2 °C al final del siglo XXI.

Adicionalmente, el Panel y otras organizaciones (Greenpeace Colombia, s. f.) predicen que, si la temperatura global supera los 2 °C, los impactos económicos, sociales, políticos, culturales y ambientales perjudicarán seriamente a todas las regiones del mundo; sin embargo, se desconoce lo que estos cambios atmosféricos significarían cabalmente para las poblaciones y comunidades biológicas.

El sector agropecuario no es ajeno a esta problemática: la agricultura produce emisiones de gas carbónico (CO_2) —generadas por actividades como la quema de sabanas y de residuos de cosechas agrícolas— y óxido nitroso —derivado del uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados—, entre otras (Saynes-Santillán, Etchevers, Paz, & Alvarado, 2016). Por su parte, la ganadería produce importantes emisiones de metano, especialmente, por el metabolismo anaeróbico de la lignina presente en los pastos (Marín, 2013). Con la búsqueda de nuevas áreas para la producción de alimentos, la expansión de la agricultura y la ganadería afectan diariamente zonas boscosas y selváticas mediante intervención directa y deforestación, que producen cambios en el uso de la tierra (Landa, Ávila, & Hernández, 2010).

Estos procesos de intervención del bosque natural para actividades agrícolas, pecuarias y de silvicultura, además de la deforestación acelerada para la obtención de madera y otros productos del bosque (como la leña), generan emisiones de gases efecto invernadero e inciden en los niveles de las poblaciones de artrópodos (Karuppaiah & Sujayanad, 2012). Los cambios en los regímenes de temperatura y precipitación implican alteraciones en las tasas de desarrollo, el voltinismo y la supervivencia de los insectos. Asimismo, actúan posteriormente sobre el tamaño, la densidad y la composición genética de las poblaciones, así como sobre el alcance de la explotación de la planta hospedera (Bale et al., 2002). El calentamiento global creará nuevas inseguridades alimentarias en las próximas décadas, y estas serán más significativas en países con bajos ingresos y con limitada capacidad de adaptación al cambio climático (Führer, 2003; Von Braun, 2007).

El Acuerdo de París, firmado en 2016, tiene como objetivo principal mantener la temperatura global por debajo del umbral crítico de 1,5 °C. Para ello,

comprometió a 195 países a promover un mundo libre de combustibles fósiles y de prácticas perjudiciales para el planeta, así como a detener la deforestación (Greenpeace, 2017), pero esto solo es posible con la ejecución de políticas gubernamentales específicamente orientadas hacia tal fin, estatuidas por los países firmantes.

Aun cuando el primer testimonio sobre control biológico en Colombia data de 1913 y su aplicación surge con la fundación del Servicio de Sanidad Vegetal del Ministerio de Agricultura en 1927 (Valenzuela, 1993), el progreso del control biológico en el sector agrícola colombiano se ha visto desfavorecido. Hasta la década de los setenta, se desarrollaron investigaciones y se trató de fomentar la utilización del control biológico en la agricultura del país, especialmente, en los cultivos de algodón, café, caña de azúcar y maíz, mediante el uso de depredadores, parasitoides, bacterias y hongos entomopatógenos (Valenzuela, 1993). Sin embargo, después de casi cien años, el uso de productos químicos en los cultivos de Colombia ha venido en aumento; de hecho, para inicios del siglo xxi, al menos una quinta parte de los ingredientes activos usados hoy en día en el país estaba prohibida o restringida en otras partes del mundo por razones ambientales o de salud pública (Nivia, 2004).

Para la producción agropecuaria del país, dicha situación, en términos de sostenibilidad, plantea retos enormes, cuyo manejo implica cambios en los sistemas de producción agropecuaria hacia modelos productivos sostenibles y agroecológicos que conlleven la obtención inocua de alimentos. Se propone, en este sentido, el control biológico como una estrategia clave en programas de manejo integrado de plagas, enfocado hacia el uso de insectos y organismos entomófagos, capaces de controlar las plagas en forma natural.

De esta manera, se aportaría al fortalecimiento de prácticas agrícolas que contribuyen a la producción de alimentos sanos, de calidad y que sustenten la soberanía alimentaria de nuestro país.

Seguridad alimentaria, plaguicidas y cambio climático

Uno de los trabajos de Olesen y Bindi (2002) presenta las consecuencias del cambio climático en los rendimientos de la agricultura en varios escenarios, y concluye que, con el aumento de la temperatura, se presentan disminuciones de los rendimientos, con diferencias contrastantes entre el rendimiento de los países desarrollados y el de los países en desarrollo. A pesar de la tecnología y del potencial de rendimiento de los cultivos, la producción de alimentos permanece altamente dependiente del clima. He aquí algunos ejemplos: durante la década de los treinta, la sequía en las grandes planicies del sur de los Estados Unidos redujo los rendimientos de maíz y de trigo hasta en un 50 %, lo que ocasionó la bancarrota en cerca de 200.000 granjas (Warrick, 1984); las anomalías climáticas causadas por El Niño en 1997 y 1998 afectaron adversamente la agricultura en el nordeste de Brasil e Indonesia (Rosenzweig, Boote, Hollinger, Iglesias, & Phillips, 2001); para la cosecha de 1998, la sequía en Estados Unidos redujo la producción de trigo y de maíz en un 30 % (Rosenzweig & Hillel, 1998); y para las últimas décadas, la persistente sequía en la región saheliana de África ha causado importantes pérdidas en la producción de alimentos (Houghton et al., 2001; Rosenzweig et al., 2001).

Scherm, Sutherst, Harrington e Ingram (2000) resaltan la importancia de plagas y enfermedades como reductores del rendimiento. Con respecto a esto se han realizado esfuerzos utilizando mapas climáticos para modelar los efectos del cambio climático en la distribución de plagas y patógenos, puesto que la capacidad de predecir impactos reales de plagas y enfermedades en climas futuros tiene un vínculo directo con la seguridad alimentaria. Existen evidencias de que el cambio climático ya ha afectado la situación geográfica y la distribución de algunas plagas y patógenos de cultivos. Se citan a continuación un par de ejemplos: la roya del tallo en trigo (causada por *Puccinia graminis*) y la marchitez bacteriana del clavel (ocasionada por *Dickeya dianthicola*) adelantaron su temporada de aparición en Finlandia, así como los pulgones *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae), en Escocia. Estos últimos, plaga clave de la agricultura en todo

el mundo, son particularmente sensibles al cambio climático debido a su baja temperatura de umbral de desarrollo, su corto tiempo de ciclo de vida y su considerable capacidad de dispersión. De igual manera ocurre con muchos insectos herbívoros que afectan los cultivos (Gregory, Johnson, Newton, & Ingram, 2009). Ingram, Gregory e Izac (2008) señalan que la inclusión de los efectos de plagas y enfermedades en los modelos de predicción sería una inversión fundamental para el futuro, puesto que conduciría a pronósticos más realistas de producción de los cultivos a escala regional, lo cual contribuiría al desarrollo de políticas más sólidas en cuanto a los programas de manejo de plagas y la seguridad alimentaria.

En cuanto a los sistemas de producción de alimentos, existe una alta tendencia al uso de agroquímicos: la FAO calcula que más de 500 mil toneladas de plaguicidas se acumulan en casi todos los países del sur (Nivia, 2004), lo que implica una grave amenaza para el medioambiente y la salud de millones de personas. De acuerdo con esta misma autora, desde la década de los setenta hasta mediados de los noventa, el mercado mundial de los agroquímicos se cuadruplicó y alcanzó ventas cercanas a los 32 billones de dólares. En el año 2002 bajaron a 27,7 billones de dólares. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación [FAO] (2016), el uso de plaguicidas en el mundo se incrementa en cerca de 100.000 toneladas de ingredientes activos cada año, sin embargo, las pérdidas ocasionadas por plagas, enfermedades y malezas se continúan calculando por encima del 30 %.

En Colombia, los sistemas de producción agrícola se basan en el uso de plaguicidas de síntesis química. Según el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) (2009), en 1974 existían 770 productos formulados de 186 ingredientes activos. En 1996 esta cifra aumentó a 1.251 productos, y los cultivos con mayor demanda de plaguicidas en el país fueron algodón, arroz, banano, café, caña de azúcar, flores, frutales, hortalizas, maíz, papa, pastos y tomate. Para 2003, Colombia aumentó el número de registros a 1.370 productos químicos, para controlar bacterias, hongos, insectos, malezas y nematodos, entre otros.

A pesar de los grandes esfuerzos para implementar el control biológico en Colombia, para 2003 el ICA contaba con solamente 27 productos biológicos o naturales registrados, los cuales representan el 6 % de los ingredientes activos totales registrados en Colombia (Álvarez, 2010; Nivia, 2004). De acuerdo con el Banco Mundial (Universidad Nacional de Colombia, 2015), Colombia aumentó el uso y la importación de plaguicidas en un 360 %. El ICA, por su parte, reporta para 2018 un total de 187 empresas productoras o comercializadoras de productos biológicos registrados en el país, entre los cuales se incluyen agentes biológicos, bioquímicos, extractos vegetales, feromonas, inoculantes biológicos y productos microbianos (ICA, 2018).

Respecto a la seguridad alimentaria, según la FAO, cerca de 795 millones de personas en el mundo no tienen suficientes alimentos para llevar una vida saludable, y para 2040 aumentará en un 20 % la cantidad de personas con inseguridad alimentaria en el mundo. De acuerdo con lo evidenciado en el conversatorio *Balance de la seguridad alimentaria en Colombia, un año después de la firma de la paz*, Colombia sigue esa misma ruta debido al conflicto armado, la violencia, los desastres naturales y el cambio climático: 25 millones de colombianos se sumaron a la situación de inseguridad alimentaria y desnutrición en el país entre 2015 y 2016. El mencionado evento concluyó que no hay políticas claras para apoyar al campesino y a los sectores más afectados (la población indígena, los afrocolombianos y los desplazados por el conflicto) en la producción de alimentos y en su comercialización (Colombia 2020, 2017). Las condiciones de seguridad alimentaria en el país continúan, entonces, siendo complejas, y según datos de la Encuesta Nacional de Situación Nutricional ("Rajados" en seguridad alimentaria, 2016), el 42,7 % de nuestra población no tiene suficientes alimentos para llevar una vida saludable y balanceada.

Gregory et al. (2009) afirman que, en términos generales, el aumento de temperatura acelera el desarrollo de las plantas, reduce la eficiencia del uso de nutrientes, aumenta el consumo de agua del cultivo, favorece el desarrollo de algunas plagas y reduce la productividad, con lo cual la seguridad alimentaria se vería amenazada. La agricultura intensiva podría adaptarse más fácilmente a las condiciones cambiantes, en contraste con la agricultura extensiva, por ello, los sistemas de bajo consumo se verían más afectados (Führer, 2003). En la actualidad, el desafío de la investigación agrícola es relacionar la dependencia de las plantas y el rendimiento de los cultivos en un clima cambiante con los problemas de seguridad alimentaria.

Dinámica de poblaciones de plagas y cambio climático

Es difícil predecir los efectos que tendrá el cambio climático sobre las invasiones biológicas en los sistemas agroecológicos desde el punto de vista de las especies de insectos, aunque algunos autores identifican varias consecuencias posibles. Hellman, Byers, Bierwagen y Dukes (2008) mencionan alteraciones en los mecanismos de diseminación e introducción de los insectos, cambios en su distribución, impactos sobre las especies existentes, establecimiento de especies invasoras nuevas y variación en la efectividad de las estrategias de control. Conocer estos comportamientos es fundamental para definir las respuestas de las especies invasoras al cambio climático y aportar sugerencias para planes de control de insectos dañinos.

Entre los factores climáticos que inciden en las dinámicas de la población de insectos, la temperatura es tal vez el más importante, puesto que tiene un impacto directo en la disminución de las tasas de desarrollo, supervivencia, fecundidad y dispersión de algunas especies de insectos dañinos. La alteración en el voltinismo también podría ser el resultado del calentamiento global, que resulta favorable para las especies multivoltinas (aquellas que tienen más de una generación por año) y podría tener como consecuencia cambios en la distribución geográfica de estas (Karuppaiah & Sujayanad, 2012). Por ejemplo, millones de hectáreas de bosque boreal están siendo alteradas por migraciones hacia el polo de escarabajos de la corteza *Dendroctonus* spp. (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), que se han originado a raíz del calentamiento del clima (Björkman & Niemelä, 2015).

En un estudio sobre las plagas del árbol urbano, Kondo (2015) incluye el calentamiento global como una de las muchas causas de las altas poblaciones de insectos plaga fitófagos en árboles urbanos en Colombia. Este autor también sugiere que las temperaturas altas pueden promover el crecimiento de los insectos plaga y causar efectos negativos a sus enemigos naturales, al mismo tiempo que disminuyen la resistencia de las plantas hospederas. Las poblaciones de insectos chupadores que infestan el árbol urbano tienen, por ejemplo, una tendencia a incrementarse en épocas secas, cuando las plantas de las que se alimentan se debilitan. Adicionalmente, debido a diferencias en las temperaturas óptimas de desarrollo entre el insecto plaga y sus enemigos naturales, las altas temperaturas de las ciudades frecuentemente favorecen el desarrollo de la plaga (Kondo, 2015). Asimismo, altas concentraciones de CO_2 en los cultivos podrían alterar el valor nutricional de las plantas, con impactos sobre la abundancia de las poblaciones de plagas y el aumento en la tasa de consumo de insectos herbívoros (Long, Ainsworth, Leakey, Nosberger, & Ort, 2006).

A continuación, se presentan estudios de caso que ilustran, para Colombia, los efectos del cambio y la variabilidad climática en la dinámica poblacional y la distribución de insectos plaga.

La cochinilla acanalada de Colombia *Crypticerya multicicatrices* Kondo y Unruh (Hemiptera: Monophlebidae): una plaga favorecida por las condiciones urbanas

La cochinilla acanalada de Colombia (CAC) *Crypticerya multicicatrices* es una especie polífaga de amplia distribución en Colombia. Kondo, Ramos-Portilla, Peronti y Gullan (2016) la reportan en unas 150 especies de plantas hospederas, entre ellas, muchas de importancia económica, como coco, aguacate, árbol del pan, mango y papaya. En Colombia continental, la CAC ha sido reportada en los departamentos de Antioquia, Atlántico, Bolívar, Cesar, Córdoba, La Guajira, Magdalena, Sucre, Tolima y Valle del Cauca, usualmente asociada a la vegetación de áreas urbanas y periurbanas, y eventualmente como plaga en cultivos de mango. Muestreos realizados por Corpoica (actualmente AGROSAVIA) entre 2013 y 2016 en árboles de mango de los municipios de Santa Marta y Ciénaga (Magdalena) documentan la diferencia en la densidad poblacional de la especie entre áreas urbanas y rurales. En al área urbana del municipio de Santa Marta se muestrearon árboles de mango, en los

Foto: Guillermo León M.

Figura 25.1. Adulto de la langosta llanera *Rhammatocerus schistocercoides* Rehn.

cuales se halló una incidencia del 88,5 %, en contraste con el área rural de Santa Marta y Ciénaga, donde solo se halló una incidencia del 16 % de la CAC.

Las diferencias entre ciudades y áreas rurales parecen estar mediadas por dos tipos de factores: ambientales (temperatura, humedad relativa, lluvia y radiación solar) y biológicos (presencia de competidores y enemigos naturales). Las ciudades son conocidas por su efecto de *isla de calor*, pues este último se acumula dentro del área urbana debido a las construcciones y actividades humanas. Este incremento de la temperatura superficial en las ciudades modifica el flujo de materia y energía en los ecosistemas urbanos (Yang, Qian, Song, & Zheng, 2016). Los ciclos biológicos de los insectos plaga del arbolado urbano no son ajenos al efecto de isla de calor de las ciudades. En el caso de la CAC, estudios de ciclo de vida realizados en condiciones semicontroladas a campo abierto (A. M. Arcila, comunicación personal, 2016) revelaron que condiciones de alta radiación solar, baja humedad relativa y poca lluvia favorecen un desarrollo más rápido y una mayor supervivencia de la CAC, dado que la lluvia es el factor que más afecta la estabilidad, especialmente, de las ninfas. De hecho, una combinación de alta temperatura, baja humedad relativa, baja pluviosidad y alta radiación solar (T 28,8 +/- 0,42 °C; HR 79,3 +/- 3,16 %; lluvia 69 mm, rad solar/hora 430,6 +/- 19,3 W/m^2) tuvo como consecuencia un ciclo de vida un 20 % más corto (82,5 +/- 9,5 días) que el registrado durante el periodo más lluvioso, más húmedo, con menor temperatura y menor radiación solar (T 27,6 +/- 0,4 °C; HR 86,3 +/- 4,1 %, lluvia 249 mm, rad solar/hora 341,9 +/- 17,8) (103,2 +/- 9,9 días).

Hasta el momento no se han realizado estudios sistemáticos para documentar la diferencia entre ciudades y áreas rurales respecto al control biológico de esta especie. Sin embargo, observaciones realizadas durante el seguimiento de la dinámica poblacional de CAC en el arbolado urbano de la ciudad de Santa Marta (A. M. Arcila, comunicación personal, 2016) revelaron que los principales enemigos naturales son

dos coccinélidos: *Anovia punica* y *Rodolia cardinalis*. El primero aparece en gran abundancia en las épocas de lluvia (que corresponden a los periodos mayo-junio y septiembre-noviembre), mientras que el segundo es más abundante en épocas secas. Al parecer, la supervivencia de *A. punica* se ve limitada cuando las condiciones son secas (humedad relativa < 65 %), lo cual fue corroborado en cría en condiciones de laboratorio. Por su parte, *R. cardinalis* sobrevive bien en condiciones de sequía y lluvia, pero es desplazada por *A. punica*, por competencia, cuando esta es muy abundante.

El caso de la langosta llanera *Rhammatocerus schistocercoides* Rehn

De 1994 a 1996, se presentaron incrementos poblacionales alarmantes de la langosta llanera *Rhammatocerus schistocercoides* Rehn (Orthoptera: Acrididae) (figura 25.1). Este insecto logró diseminarse en la Orinoquía y afectó las sabanas nativas de la altillanura colombiana hasta el piedemonte llanero, con el consumo de pastos (Poaceae) como el guaratara (*Axonopus* sp.) y el pasto peludo (*Trachypogon* sp.), lo que le causó daños a la ganadería de la región (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria [AGROSAVIA], Instituto Colombiano Agropecuario [ICA], & Programa Nacional de Transferencia de Tecnología Agropecuaria [Pronatta), 1996].

Montealegre y Boshell (1997) afirman que esta especie es autóctona de la Orinoquía colombo-venezolana y de las sabanas nativas del Mato Grosso brasilero. Con base en la comparación climática de dos localidades representativas del hábitat de la langosta en Colombia y Brasil, estos autores concluyeron que los vientos alisios bajos provenientes del cuadrante nordeste colombo-venezolano favorecieron el desplazamiento poblacional de la plaga hacia los Llanos Orientales de Colombia. El ciclo biológico univoltino (una generación por año) de la especie se sincroniza con la precipitación monomodal de la región, de tal manera que la época seca entre enero y febrero coincide con la madurez de los adultos para su cópula y ovoposición, y el inicio de lluvias durante marzo y abril da lugar a la eclosión de los huevos para una nueva generación (Corpoica et al., 1996; León, 1996).

La precipitación es un factor abiótico determinante para el desarrollo de *R. schistocercoides*, especialmente, durante la eclosión de los huevos y los primeros estados ninfales del insecto, dado que viven en el suelo de la sabana nativa de la región (figura 25.2). En la altillanura colombiana, las ninfas nacen en abril, viven hasta septiembre y reciben al menos el 64 % del total de lluvias anuales. En 1994, la precipitación fue escasa, lo cual pudo haber provocado la dispersión de la plaga, mientras que para 1996 las poblaciones de la langosta disminuyeron, pues la alta precipitación (1.451 mm de abril a septiembre, durante las etapas ninfales), en especial, durante el mes de abril —un 56 % más lluvioso con respecto a su promedio histórico—, pudo haber afectado la supervivencia de las ninfas recién nacidas del insecto (Corpoica et al., 1996; León, 1996; Montealegre & Boshell, 1997).

Veinte años después (durante 2014 y hasta la fecha), se han reportado algunos brotes de langosta en la Orinoquía colombiana, pero no se han registrado focos de la plaga en las cantidades poblacionales ocurridas entre 1994 y 1996. Las condiciones climáticas de la altillanura no son ideales, pero tampoco limitantes para el insecto, por lo cual este se estableció en dicho ecosistema. No obstante, con la ayuda de los vientos, tiende a desplazarse hacia el piedemonte de la cordillera Oriental, donde las condiciones bióticas y climáticas le son más adversas; por ello, a medida que las poblaciones se acercan al piedemonte, van desapareciendo (Corpoica et al., 1996; León, 1996; Montealegre & Boshell, 1997).

Para afrontar el problema desde el punto de vista del manejo biológico de la plaga, AGROSAVIA estudió y evaluó varias cepas de hongos entomopatógenos, entre ellos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium flavoviride* (utilizado para el control de la langosta migratoria en África) y *Metarhizium anisopliae*. Los resultados de las investigaciones mostraron controles con *M. anisopliae* superiores al 70 % sobre ninfas de la plaga (Ebrath et al., 2000) (figura 25.3). Las cepas más eficaces de esta especie se mantienen almacenadas bajo crioconservación y actualmente se encuentran viables para su reactivación en el Banco de Germoplasma de Microorganismos, administrado por Corpoica en el CI Tibaitatá.

El caso de la broca del café en áreas productoras de Colombia

En un escenario de aumento de la temperatura global, las especies tienen varias opciones para lidiar con las nuevas condiciones: variación genética, selección natural, adaptación, cambios comportamentales y cambios en distribución latitudinal o altitudinal. A continuación, se hace una revisión de los resultados de varios trabajos que abordan, con diferentes metodologías, el tema de la distribución y abundancia de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) bajo los efectos del cambio climático. Se revisarán con mayor detalle los estudios realizados para Colombia.

Jaramillo et al. (2011) modelaron la distribución potencial de la broca del café en escenarios de cambio climático para las regiones productoras del este de África empleando el *software* Climex. Se espera que el área de distribución aumente en algunos lugares y disminuya en otros, pero en general el modelo predice que las poblaciones de la broca aumentarán, pasando de 1,0-4,5 generaciones/año a 5-10 en las partes altas (1.400 a 1.800 m s. n. m.) hasta 11-16 en altitudes medias (900-1.300 m s. n. m.) para el año 2050. Estas proyecciones afectarán negativamente la forma de vida de los productores.

Resultados similares a los anteriores fueron reportados por Ramírez, Daza y Peña (2015) para la misma especie en Colombia, quienes usaron otras técnicas para cuantificar el cambio en condiciones favorables para el desarrollo de la broca. Mediante el empleo de series de datos climáticos (20 > años) diarios de 29 estaciones experimentales de Cenicafé, dispersas por todo el país, se calcularon los acumulados mensuales multianuales de grados día cafeto y grados día broca (método del triángulo sencillo). Se encontró un incremento generalizado en el tiempo térmico (condiciones óptimas) para el cafeto y la broca, especialmente, en las estaciones ubicadas a mayor altura sobre el nivel del mar; sin embargo, en los mismos rangos óptimos altitudinales actuales (1.400 a 1.700 m s. n. m. para el cafeto y < 1.600 m s. n. m. para la broca) se ha incrementado en mayor proporción el número de grados día cafeto y grados día broca. Esto

Fotos: Guillermo León M.

Fig**ura 25.2.** Pastos nativos de los llanos orientales invadidos por brotes poblacionales de la langosta llanera *R. schistocercoides*.

Foto: Carlos Espinel

Figura 25.3. Ninfa de *R. schistocercoides* afectada por el entomopatógeno *M. anisopliae*.

implicaría un mayor número de generaciones por año para la broca y una mayor incidencia en el cultivo.

Al comparar estas variables entre años Niño, Niña y neutro, se encontró que el incremento en tiempo térmico para la broca es mayor en años Niño. No solamente el aumento en la temperatura promedio, también el aumento en la variabilidad climática (por ejemplo, la frecuencia de ocurrencia de periodos Niño-Niña) afecta las poblaciones de la broca. Constantino (2010), en un estudio realizado en la región del Eje Cafetero en Colombia, reporta que el porcentaje de infestación por broca se correlacionó positivamente con la temperatura y negativamente con la altitud (1.200-1.700 m s. n. m.) en periodos Niño, Niña y neutro por igual. Sin embargo, durante los periodos Niño, la reproducción de la broca es mayor: por ejemplo, a una altitud de 1.281 m s. n. m., un solo fruto brocado en el suelo infestó 150 frutos en el árbol durante un periodo Niña, 590 en un periodo normal y 959 en un periodo Niño. Durante los periodos secos prolongados propios del fenómeno de El Niño, la broca se reproduce en grandes cantidades en los frutos que quedan en el árbol y en el suelo.

Finalmente, empleando el enfoque de modelación de nicho ecológico, el proyecto "Investigación sobre los efectos del cambio climático en la distribución altitudinal de insectos plaga del café y sus enemigos naturales en la zona cafetera de Colombia" (ejecutado por Corpoica, Ideam, Cenicafé y el Instituto Alexander von Humboldt, entre 2008 y 2011) buscó identificar los efectos potenciales del cambio climático sobre la distribución altitudinal de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) y generar mapas de riesgo de esta especie en dos áreas cafeteras de Colombia. En este estudio, mediante el *software* MaxEnt como herramienta de modelación, se construyeron mapas de distribución potencial de *H. hampei* actuales y proyectados a 2020, en dos escenarios de cambio climático: cuatro modelos GCM[1] del IPCC[2]

1 *General circulation model* o modelo de circulación general.

2 Intergovernmental Panel on Climate Change o Panel Intergubernamental de Cambio Climático.

pertenecientes al SRES A2a[3] 2020 (CGCM2.0, MK2, HadCM3, NIES99) y cuatro modelos pertenecientes al SRES B2A[4] 2020.

Los datos de clima actual se obtuvieron de la base de datos mundial WorldClim (Hijmans, Cameron, Parra, Jones, & Jarvis, 2005), constituida por 19 variables bioclimáticas, en formato *raster/grid* a una resolución de 30 arcosegundos (~ 1 km en el Ecuador). Para alimentar el modelo, se usaron 75 registros georreferenciados de *H. hampei* asociados a cultivos de café en Colombia. Estos registros

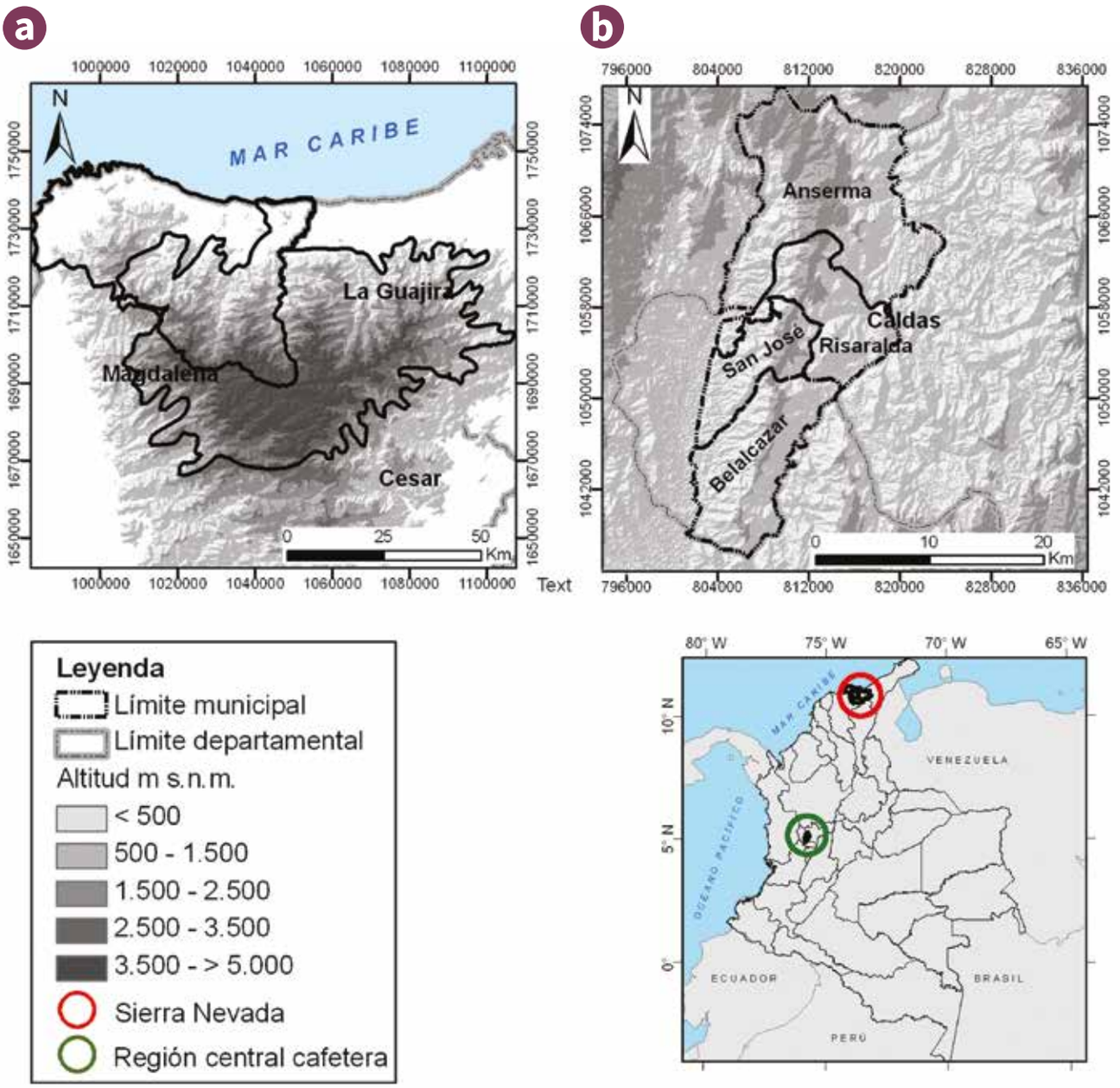


Figura 25.4. Ubicación del área de estudio. a. Sierra nevada de Santa Marta; b. Región central del Eje Cafetero.

Fuente: Elaboración propia

3 Escenario de cambio climático tendiente a la regionalización, con enfoque de desarrollo económico de heterogeneidad social, el cual presentó un aumento de temperatura entre 2,0 y 5,4 °C entre 1900 y 2100 (Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), 2007).

4 Escenario de cambio climático tendiente a nivel local y regional, con prioridad en cuidado del medioambiente e igualdad social, el cual presentó un aumento de temperatura entre 1,4 y 3,8 °C entre 1900 y 2100 (IPCC, 2007).

provenían de tres fuentes principales: museos e institutos; artículos científicos publicados, literatura gris e informes técnicos; y muestreos de campo realizados en las áreas para las cuales se construyó el modelo en el Eje Cafetero y la sierra nevada de Santa Marta (figura 25.4). Dentro de los museos e institutos, vale la pena mencionar los siguientes: Instituto de Ciencias Naturales (ICN), Museo Entomológico Francisco Luis Gallego (MEFLG) de la Universidad Nacional de Colombia (sede Medellín), Colección Entomológica de la Universidad de Antioquia, Museo de Entomología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia (sede Bogotá), Colección Entomológica de Cenicafé y Colección Entomológica de Corpoica (Tibaitatá).

Para la broca del café, las variables que más aportaron en la construcción del modelo fueron la altitud (con el 56,3 %), la isotermalidad (con el 16,8 %) y la temperatura del cuatrimestre más caliente (con el 6,9 %). El modelo de *H. hampei* reflejó un alto valor de área bajo la curva (AUC, por su sigla en inglés) (0,964), lo que indica un buen ajuste del modelo para la predicción de la distribución. Las áreas óptimas para el establecimiento de la broca (>60 % de probabilidad de presencia de esta) incrementaron en ambos escenarios (A2 y B2) para la sierra nevada de Santa Marta (figura 25.5). Para el escenario A2, el porcentaje estimado de incremento fue del 34 %, mientras que para el escenario B2 fue del 66 %. En contraste, en el Eje Cafetero, las áreas óptimas presentaron una tendencia a mantenerse (figura 25.6): tanto para el escenario actual como para los dos escenarios del 2020, las áreas óptimas se encuentran en altitudes de entre los 1.000 m y los 2.000 m. Esto concuerda con los hallazgos de Ramírez et al. (2015), en el sentido de que las áreas óptimas para la broca del café tienden a conservarse en el mismo rango altitudinal actual.

Los resultados de los trabajos revisados concuerdan en que se esperan cambios en la distribución de la broca del café, con una tendencia al incremento en las áreas óptimas. La tendencia respecto al rango altitudinal no es muy clara aún, pero se espera que, por lo menos en su rango óptimo actual, incremente el número de generaciones por año en respuesta al incremento del tiempo térmico.

Control biológico y enfoque hacia el cambio climático en Colombia

A pesar de la dependencia de los productos agroquímicos en la agricultura, Colombia ha sido un país líder en el uso y aplicación del control biológico en Latinoamérica. En Colombia se ha utilizado una amplia gama de enemigos naturales para el control de plagas de algodón, árboles forestales, caña de azúcar, flores, frutales, hortalizas, palma de aceite, sorgo, maíz y yuca, entre otros (capítulos 5-10). El sistema de control de plagas de caña de azúcar en el Valle del Cauca es el ejemplo clásico de la eficacia del control biológico en Colombia.

Desde los años sesenta, se iniciaron programas de producción y liberación de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) en varios ingenios azucareros. Durante la década de los setenta, se crearon más de 20 laboratorios de producción de *Trichogramma* spp. y otros parasitoides para el control biológico de plagas en caña de azúcar, que fueron usados también en cultivos de algodón y soya (Valenzuela, 1993).

Actualmente, cerca de 225.000 ha sembradas de caña de azúcar en el Valle del Cauca se manejan con un modelo de MIP basado en control biológico, aunque no se conoce el efecto del cambio climático sobre esta estrategia de control. Así mismo, se desconoce lo que pasará en nuevas áreas de siembra de gran extensión, como la Orinoquía colombiana, recientemente incorporadas a la producción de cultivos de caña de azúcar, caucho, maíz, forestales, soya y otros productos. En cultivos de caucho, la combinación del control biológico mediante liberaciones de *Trichogramma exiguum* Pinto & Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae) y aplicaciones del *Baculovirus erinnyis* ha demostrado resultados extraordinarios de control del gusano cachón *Erinnyis ello* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae), una de las principales plagas de este cultivo en Colombia. Las liberaciones oportunas de *Trichogramma* permiten un parasitismo sobre huevos del gusano cachón de hasta el 92 % y las aplicaciones de *Baculovirus erinnyis* han alcanzado control

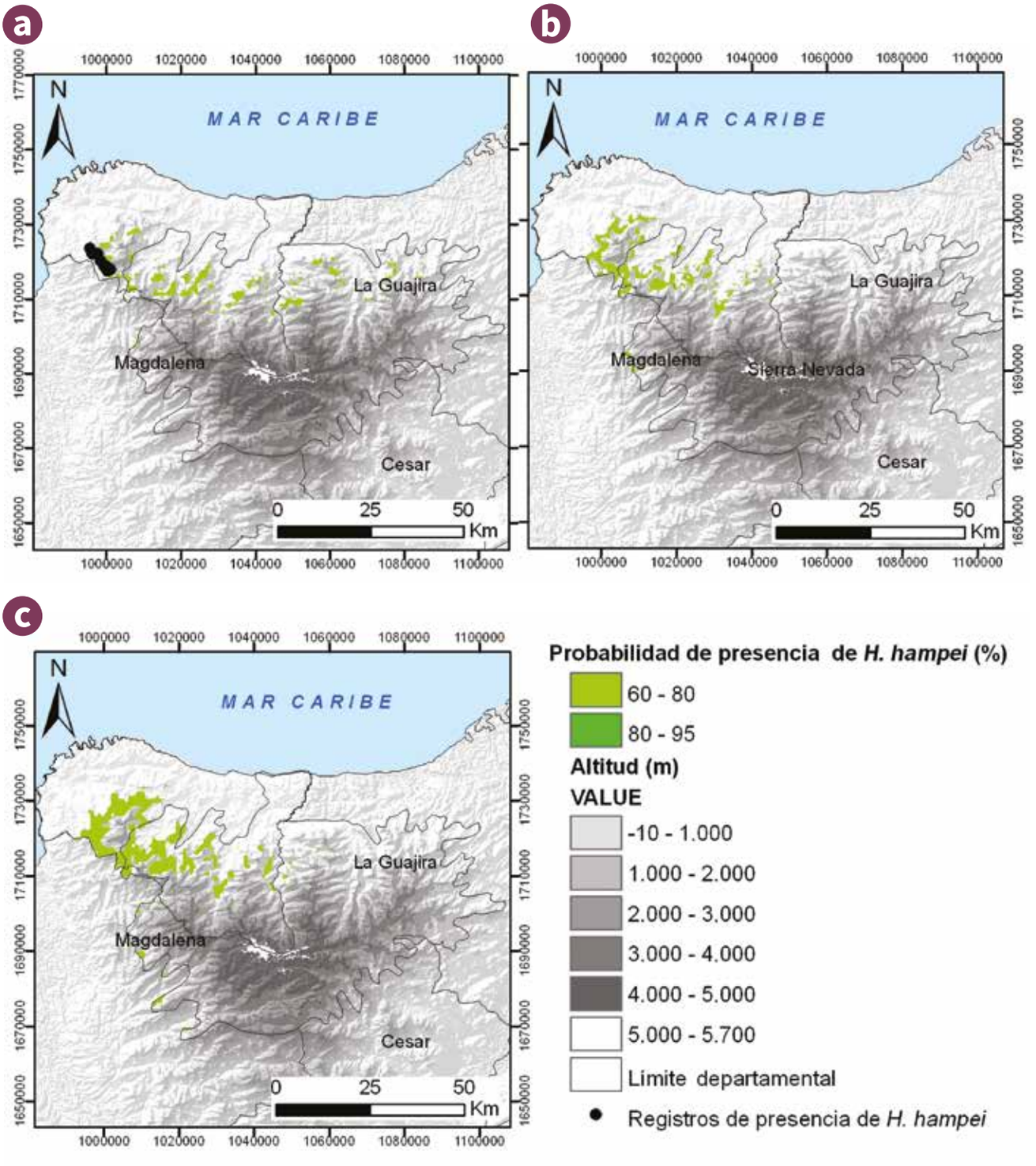


Figura 25.5. Relación de áreas climáticamente adecuadas de *Hypothenemus hampei* en la Sierra Nevada de Santa Marta. a. Escenario actual; b. Escenario A2 2020; c. Escenario B2 2020.

Fuente: Elaboración propia

sobre las larvas de gusano cachón por encima del 90 %. Como resultado paralelo, se observa el incremento de una gran cantidad de especies de enemigos naturales, parasitoides, depredadores y entomopatógenos que actúan como controladores de huevos, larvas, pupas y adultos de gusano cachón *E. ello* y otras plagas del caucho (León, Beltrán, & Campos, 2010), lo cual contribuye a la producción sostenible de este cultivo en las regiones productoras del país.

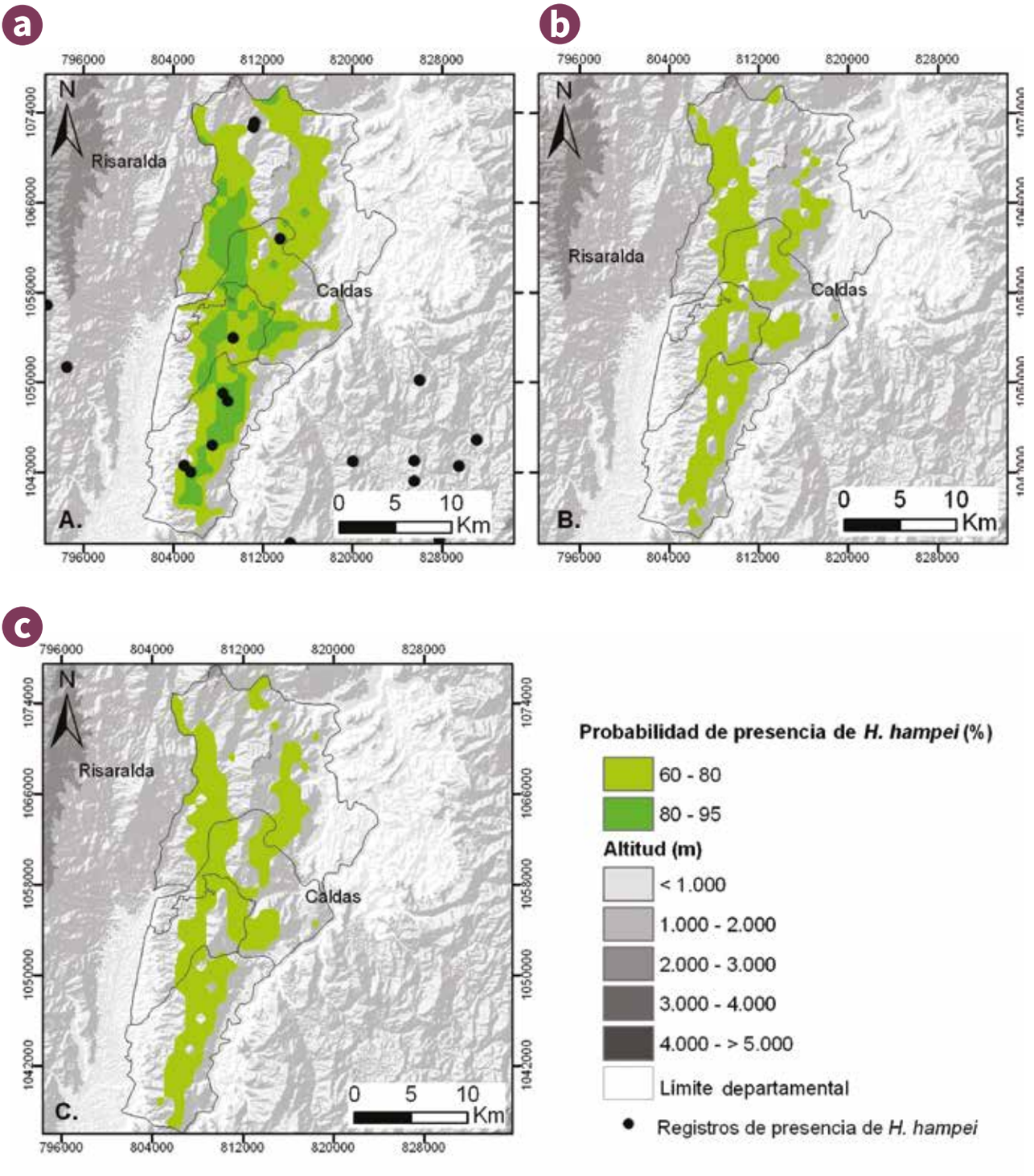


Figura 25.6. Relación de áreas climáticamente adecuadas de *Hypothenemus hampei* en la región central de la zona cafetera. a. Escenario actual; b. Escenario A2 2020; c. Escenario B2 2020.

Fuente: Elaboración propia

El sistema silvopastoril para la producción ganadera propuesto por Corpoica y otras entidades como Fedegán es un claro ejemplo de sistema sostenible que se debe implementar en el país frente al cambio climático. Según el Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC), en 27 departamentos se utiliza más tierra de la que se debería para la ganadería de pastoreo intensivo, semiintensivo o extensivo. En efecto, de los 14 millones de hectáreas que están destinadas a la ganadería, solo 2,7 millones son aptas para tal fin (¿Por

qué es tan grave que la ganadería en Colombia use más tierra de la que debería?, 2017); la deforestación para el uso de la tierra en ganadería de 1990 a 2015 fue del 60 %, y solo en 2016 aumentó un 44 %. Para minimizar esta situación, se proponen programas de producción ganadera bajo el sistema silvopastoril. Con este sistema, se reconvierten las fincas en corredores de biodiversidad con una mayor cantidad de árboles, lo que implica mayor sostenibilidad. Además, los sistemas silvopastoriles presentan otras ventajas: soportan un 24 % más de ganado que los sistemas tradicionales; registran aumentos del 155 % en la productividad de leche (Rubiano, 2018); sus árboles generan una mayor captura de CO_2; se aumenta la biodiversidad de los sistemas, puesto que estos sirven de hábitat para especies de aves, mamíferos e insectos; y se favorece la conexión con los bosques nativos que aún se conservan en algunas fincas.

El papel de la investigación en ciencia y tecnología agropecuaria sobre control biológico ha sido fundamental para la generación de programas de manejo de plagas en la agricultura del país. Frente a la realidad del cambio climático, la investigación debe continuar y enfocarse en conocer el efecto de las variaciones del clima sobre las relaciones bióticas de enemigos naturales, sistemas productivos, plagas y técnicas de control de estas; todo ello, desde la perspectiva de producción agropecuaria sostenible y respetuosa con los agroecosistemas productivos que garantice una alimentación inocua y de calidad.

Como ejemplo de lo anterior, Corpoica generó un programa de manejo integrado de plagas del maracuyá (Varón, Monje, & Santos, 2011) basado en el monitoreo de poblaciones, aplicación de extractos vegetales, manejo cultural y uso de control biológico mediante liberaciones periódicas del depredador *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae).

El programa fue sometido a validación en el departamento del Meta, donde se comprobó la eficacia del depredador liberado. Además, los análisis de toxicidad en la fruta producida en las parcelas con este programa evidenciaron una producción totalmente inocua, sin presencia de residuos tóxicos; las concentraciones de agroquímicos encontradas en la fruta del programa MIP de AGROSAVIA fueron muy bajas con respecto a los altos niveles de toxicidad encontrados en el sistema convencional de los agricultores. Adicionalmente, con el programa de AGROSAVIA, se incrementó la presencia de enemigos naturales de insectos dañinos para el cultivo, así como las poblaciones de abejas y abejorros polinizadores, que se ven fuertemente afectadas con los sistemas de producción dependientes del uso de agroquímicos en el cultivo (León & Miranda, 2018).

Conclusiones y perspectivas

Desde la óptica del manejo fitosanitario, el uso de agroquímicos se incrementó a partir de la Revolución Industrial y, a finales del siglo pasado, se consolidó como la base fundamental para el control de plagas agrícolas en el mundo. Este panorama conlleva la insostenibilidad de los sistemas de producción, dados los costos, los residuos tóxicos, los problemas ambientales y de salud pública que genera este modelo de producción de alimentos. En Colombia, la industria agroquímica para el manejo de plagas y enfermedades de los cultivos se ha fortalecido con políticas que favorecen su desarrollo, lo cual afecta la producción sostenible e inocua. Sin embargo, como se ha documentado extensamente en este libro, Colombia tiene una rica biodiversidad y controladores biológicos que se deben utilizar a su favor para el manejo de las nuevas plagas y enfermedades que afectan la agricultura debido a los efectos del cambio climático. La biodiversidad del país también representa un potencial ilimitado de oportunidades para desarrollar y encontrar nuevos agentes de control, que ayudarían a mitigar el daño causado por las nuevas plagas debido al calentamiento global.

Los ejemplos presentados en este capítulo evidencian situaciones concretas de los sistemas de producción nacionales con dificultades que se deben tratar mediante estrategias basadas en la preservación de la biodiversidad y el uso de las tecnologías disponibles. Frente al desafío de seguridad alimentaria, la producción inocua y el cambio climático en el país, los sistemas óptimos de manejo de plagas implican la utilización del control biológico como herramienta tecnológica sostenible y eficaz. Para ello, se hace necesaria una mirada gubernamental hacia la implementación de los acuerdos de protección del medioambiente frente al cambio climático, así como la voluntad política para fortalecer la investigación y promover programas de producción inocua, sostenible y competitiva que favorezcan el desarrollo del sector agropecuario colombiano.

Referencias

Álvarez, L. (2010). *La problemática con los pesticidas en Colombia*. Recuperado de http://www.es.lapluma.net/index.php?option=com_content&view=article&catid=89:economia-de-la-naturaleza&id=926:conferencia-la-problematica-con-los-perticidad-en-colombia&Itemid=420.

Bale, J., Masters, G. J., Hodkinson, I. D., Awmack, C., Bezemers, T. M., Brown, V., … Whittaker, J. B. (2002). Herbivory in global climate change research: Direct effects of rising temperature on insect herbivores. *Global Change Biology*, *8*(1), 1-16. doi:10.1046/j.1365-2486.2002.00451.x.

Björkman, C., & Niemelä, P. (Eds.). (2015). *Climate change and insect pests* (CABI Climate change series 7). Oxford, Reino Unido: CAB International.

Colombia, Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. (2018). *Panel intergubernamental de cambio climático*. Recuperado de http://www.minambiente.gov.co/index.php/convencion-marco-de-naciones-unidas-para-el-cambio-climatico-cmnucc/panel-intergubernamental-de-cambio-climatico-ipcc.

Colombia2020. (2017, diciembre 4). ¿Cómo está la seguridad alimentaria en Colombia a un año del acuerdo de paz? *El Espectador*. Recuperado de https://colombia2020.elespectador.com/pais/como-esta-la-seguridad-alimentaria-en-colombia-un-ano-del-acuerdo-de-paz.

Constantino, L. M. (2010). *La broca del café: un insecto que se desarrolla de acuerdo con la temperatura y la altitud*. Recuperado de http://cafe-noticias.over-blog.com/article-la-broca-del-cafe-un-insecto-que-se-desarrolla-de-acuerdo-con-la-temperatura-y-la-altitud-54492018.html.

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica), Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), & Programa Nacional de Transferencia de Tecnología Agropecuaria (Pronatta). (1996). *Encuentro nacional sobre la langosta llanera Rhammatocerus schistocercoides Rehn*. Recuperado de http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/6436/1/089.pdf.

Ebrath, E. E., Espinel, C., Gómez, M. I., Villamizar, L. F., Cotes, A. M., Gutiérrez, J., … León, G. (2000). *La langosta llanera en Colombia*. Recuperado de http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/6442/1/Control%20biologico%20de%20la%20langosta.pdf.

Führer, J. (2003). Agroecosystem responses to combinations of elevated CO_2, ozone, and global climate change. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *97*(1-3), 1-20. doi:10.1016/S0167-8809(03)00125-7.

Greenpeace. (2017). *Acuerdo de París*. Recuperado de www.greenpeace.org/colombia/es/campanas/cambio-climatico/Acuerdo-de-Paris/.

Greenpeace Colombia. (s. f.). *Campañas cambio climático*. Recuperado de https://www.greenpeace.org/colombia/es/campanas/cambio-climatico/.

Gregory, P., Johnson, N., Newton, A., & Ingram, J. (2009). Integrating pests and pathogens into the climate change/food security debate. *Journal of Experimental Botany*, *60*(10), 2827-2838. doi:10.1093/jxb/erp080.

Hellmann, J., Byers, J., Bierwagen, B., & Dukes, J. (2008). Five potential consequences of climate change for invasive species. *Conservation Biology*, *22*(3), 534-543. doi:10.1111/j.1523-1739.2008.00951.x.

Hijmans, R. J., Cameron, S. E., Parra, J. L., Jones, P. G., & Jarvis, A. (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas international. *Journal of Climatology*, *25*(15), 1965-1978. doi:10.1002/joc.1276.

Houghton, J. T., Ding, Y., Griggs, D. J., Noguer, M., Van der Linden, P. J., Dai, X., … Johnson, C. A. (Eds). (2001). *Climate change 2001: The scientific basis. Contribution of working group I to the third assessment report of the intergovernmental panel on climate change*. Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press.

Ingram, J., Gregory, P., & Izac, A.-M. (2008). The role of agronomic research in climate change and food security policy. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *126*(1-2), 4-12. doi:10.1016/j.agee.2008.01.009.

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2018). *Empresas registradas plaguicidas marzo de 2018*. Recuperado de https://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Regulacion-y-Control-de-Plaguicidas-Quimicos/

Listados/2009/EMPRESAS-PLAGUICIDAS-PQUA-15-04-09.aspx.

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). (2007). Summary for policymakers. En S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K. B. Averyt, … H. L. Miller (Eds.), *Climate change 2007: The physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assesment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press.

Jaramillo, J., Muchugu, E., Vega, F. E., Davis, A., Borgemeister, C., & Chabi-Olaye, A. (2011). Some like it hot: The influence and implications of climate change on coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and coffee production in East Africa. *Plos One*, *6*(9), e24528. doi:10.1371/journal.pone.0024528.

Karuppaiah, V., & Sujayanad, G. (2012). Impact of climate change on population dynamics of insect pests. *World Journal of Agricultural Sciences*, *8*(3), 240-246.

Kondo, T. (2015, julio). *Insectos plaga del árbol urbano con énfasis en los insectos escama (Hemiptera: Coccoidea) en Colombia*. Documento presentado en el Simposio Entomología Forestal. XLI Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología (Socolen). Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Medellín, Colombia.

Kondo, T., Ramos-Portilla, A. A., Peronti, A. L. B. G., & Gullan, P. J. (2016). Known distribution and pest status of fluted scale insects (Hemiptera: Monophlebidae: Iceryini) in South America. *Redia*, *XCIX*, 187-195. doi:10.19263/REDIA-99.16.24.

Landa, R., Ávila, B., & Hernández, M. (2010). *Cambio climático y desarrollo sustentable para América Latina y el Caribe. Conocer para comunicar.* Recuperado de http://www.ceiba.org.mx/publicaciones/rosalvalanda/CCYDS,_ALyC.pdf.

León, M. G. (1996). *El grillo de los llanos orientales. Biología, hábitos y recomendaciones para su manejo. Boletín Técnico*. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/270161321_El_Grillo_de_los_Llanos_Orientales_Biologia_Habitos_y_recomendaciones_para_su_manejo.

León, M. G., Beltrán, J., & Campos, J. (2010). *Enemigos naturales y manejo integrado del gusano cachón (Erinnyis ello) en el cultivo del caucho (Hevea brasiliensis)*. Villavicencio, Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica).

León, M. G., & Miranda, T. (2018). Producción inocua de maracuyá con un programa MIP de Corpoica en el departamento del Meta, Colombia. *Boletín Informativo*, *29*, 5.

Long, S., Ainsworth, E., Leakey, A., Nosberger, J., & Ort, D. (2006). Food for thought: lower-than-expected crop yield stimulation with rising CO_2 concentrations. *Science*, *312*(5782), 1918-1921. doi:10.1126/science.1114722.

Marín, A. (2013). *Estimación del inventario de emisiones de metano entérico de ganado lechero en el departamento de Antioquia, Colombia* (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Medellín. Recuperado de http://www.bdigital.unal.edu.co/11666/1/43979169.2014.pdf.

Montealegre, F., & Boshell, F. (1997). Caracterización climática de la langosta brasilera *Rhammatocerus schistocercoides* en la Orinoquia colombiana. *Acta Agronómica*, *47*(1), 35-44. doi:10.15446/acag.

Nivia, E. (2004). Los plaguicidas en Colombia. *Revista Semillas*, *21*, 11-16. Recuperado de http://www.semillas.org.co/es/los-plaguicidas-en-colombia.

Olesen, J., & Bindi, M. (2002). Consequences of climate change for European agricultural productivity, land use and policy. *European Journal of Agronomy*, *16*(4), 239-262. doi:10.1016/S1161-0301(02)00004-7.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO). (2016). *Faostat. Pesticides use*. Recuperado de http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP.

¿Por qué es tan grave que la ganadería en Colombia use más tierra de la que debería? (2017). *Semana*. Recuperado de www.semana.com/nacion/articulo/ganaderia-en-colombia-utiliza-mas-tierra-de-la-que-deberia-segun-igac/529191.

"Rajados" en seguridad alimentaria. (2016). *Dinero*. Recuperado de https://www.dinero.com/pais/articulo/cifras-de-seguridad-alimentaria-en-colombia-para-el-2016/219321.

Ramírez, C., Daza, J., & Peña, A. (2015). Tendencia anual de los grados día cafeto y los grados día broca en la región andina ecuatorial en Colombia. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, *16*(1), 51-63. doi:10.21930/rcta.vol16_num1_art:379.

Rosenzweig, C., & Hillel, D. (1998). *Climate change and the global harvest: Potential impacts of the Greenhouse effect on agriculture*. New York, EE. UU.: Oxford University Press.

Rosenzweig, C., Iglesias, A., Yang, X., Epstein, P., & Chivian, E. (2001). Climate change and extreme weather events implications for food production, plant diseases, and pests. *Global Change & Human Health*, *2*(2), 90-91.

Rubiano, M. P. (2018, abril 29). 3.000 ganaderos colombianos que frenan el cambio climático. 299 de abril de 2018. *El Espectador*. Recuperado de www.elespectador.com/noticias/medio-ambiente/3000-ganaderos-colombianos-que-frenan-el-cambio-climatico-articulo-752992.

Saynes-Santillán, V., Etchevers, J. D., Paz, F., & Alvarado, L. O. (2016). Emisiones de gases de efecto invernadero en sistemas agrícolas de México. *Terra Latinoamericana*, *34*, 83-96.

Scherm, H., Sutherst, R., Harrington, R., & Ingram, J. (2000). Global networking for assessment of impacts of global change on plant pests. *Environmental Pollution, 108*(3), 333-341. doi:10.1016/S0269-7491(99)00212-2.

Universidad del Rosario. (s. f.). *El cambio climático en Colombia*. Recuperado de http://repository.urosario.edu.co/bitstream/handle/10336/1052/80087794.pdf.

Universidad Nacional de Colombia [Agencia de noticias UN]. (2015). *En 20 años Colombia aumentó uso de plaguicidas en un 360 %*. Recuperado de http://agenciadenoticias.unal.edu.co/detalle/article/en-20-anos-colombia-aumento-uso-de-plaguicidas-en-un-360.html.

Valenzuela, G. (1993). Aspectos históricos del control biológico. Itinerario del control biológico de plagas agrícolas en Colombia. En *Control Biológico en Colombia. Historia, Avances, proyecciones* (pp. 1-9). Palmira, Colombia: Universidad Nacional de Colombia y Celater, Biológicos Perkins.

Varón, E., Monje, B., & Santos, O. (2011). *Manual técnico de manejo de trips en maracuyá (Passiflora edulis)*. Neiva, Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica).

Von Braun, J. (2007). *The world food situation: new driving forces and required actions*. Washington, D. C., EE. UU.: International Food Policy Research Institute (IFPRI).

Warrick, R. A. (1984). The possible impacts on wheat production of a recurrence of the 1930s drought in the U.S. Great Plains. *climatic change*, *6*(1), 5-26. doi:10.1007/BF00141665.

Yang, L., Qian, F., Song, D. X., & Zheng, K. J. (2016). Research on urban Heat-island effect. *Procedia Engineering, 169*, 11-18. doi:10.1016/j.proeng.2016.10.002.

Índice temático

A

Ácaros, control biológico de, 720, 733

Aceratoneuromyia indica, 505

A. indica, 505

Acerophagus coccois, 528, 529

A. coccois, 529

Ácido

Ácido jasmónico, 163, 174, 199, 200

Ácido salicílico, 100, 102, 103, 155, 805, 904, 1001

Acuerdo de París, 1028

Adalia bipunctata, 776

Adaptación

Adaptación ecológica, 95

Adaptación, capacidad de, 523

Adaptación, proceso de, 187

Adopción

Adopción de tecnologías, 106, 787

Adopción de la tecnología, limitantes de la, 726

Adopción del control biológico, 220

Adopción de los biofungicidas, 244

Adopción de nuevas tecnologías, 442, 619, 783

Adopción de métodos, 442

Aenasius vexans, 528

A. vexans, 529

Aflatoxinas, 224, 228, 1028

African cassava mosaic virus, 87

Aganaspis pelleranoi, 500, 501, 503, 504, 506

A. pelleranoi, 505

Aganaspis sp., 501, 503

Agentes antivirales, 88, 92, 93

Agentes de control biológico, 42, 44, 49, 50, 51, 60, 72, 78, 85, 86, 95, 99, 101, 102, 104, 105, 112, 117, 118, 146, 148, 149, 151, 155, 156, 161, 162, 164, 169, 170, 183, 189, 190, 200, 201, 230, 232, 235, 237, 240, 246, 276, 280, 298, 300, 324, 336, 341, 361, 370, 397, 399, 464, 471, 477, 489, 493, 498, 596, 598, 600, 608, 609, 611, 613, 647, 655, 694, 695, 698, 705, 709, 710, 720, 726, 731, 734, 736, 738, 766, 769, 771, 777, 779, 780, 782, 783, 784, 801, 803, 804, 806, 811, 826, 855, 856, 869, 872, 880, 882, 886, 887, 889, 891, 898, 926, 932, 933, 936, 952, 963, 971, 972, 974, 975, 976, 977, 978, 980, 1003, 1038, 1051

ACB, 44, 47, 146, 148, 149, 150, 170, 202, 203, 600, 655, 694, 695, 701, 702, 708, 731, 932, 980

Agregación, de feromonas, 412, 414, 421, 423, 436, 437

Agricultura de precisión, 148, 787, 788

Agrobacterium radiobacter, 150, 774

Agrobacterium tumefaciens, 151, 889, 893, 894

A. tumefaciens, 890

Agrosistemas, 381, 1019, 1020

Aislamiento

Aislamiento Bb9114, 347

Aislamiento Bb9218, 359

Aislamiento CHA0, 321

Aislamiento de AgMNPV, 388

Aislamiento de *B. bassiana*, 937, 938

Aislamiento de *B. thuringiensis* ssp. *morrisoni* var. *thuringiensis*, 938

Aislamiento de bacterias, 74, 110

Aislamiento de CpGV, 387

Aislamiento de feromonas, 744, 748, 749

Aislamiento de hongos endófitos, 864

Aislamiento de *L. lecanii*, 360

Aislamiento de la cepa Vl026, 349, 360, 613, 704

Aislamiento de *M. anisopliae*, 360, 938

Aislamiento de *M. brunneum*, 928

Aislamiento de microorganismos, 864, 887, 890

Aislamiento de proteínas, 960, 975

Aislamiento de *T. harzianum*, 100, 105

Aislamiento de *T. koningiopsis*, 611, 612
Aislamiento de *T. reesei*, 100
Aislamiento de *T. saturnisporum*, 100
Aislamiento de *T. virens*, 100
Aislamiento de *T. viride*, 100
Aislamiento nativo de SfNPV, 385, 386
Aislamiento nativo Th003, 197, 611
Aislamiento NPV003, 386
Aislamiento T39, 104, 105
Aislamiento Th003, 184, 612
Aislamiento Th034, 184
Aislamiento VG003, 615
Aislamiento Vl026, 349, 360, 613
Aislamientos atoxigénicos, 1028
Aislamientos Bv056, 613
Aislamientos de *Azospirillum* spp., 153
Aislamientos de *B. bassiana*, 646, 937
Aislamientos de bacterias, 110
Aislamientos de *C. minitans*, 163
Aislamientos de *Fusarium solani*, 151
Aislamientos de levaduras, 84, 242, 610
Aislamientos de *M. anisopliae*, 353
Aislamientos de NPV, 390
Aislamientos de *Pichia onychis*, 236
Aislamientos de *Pseudomonas fluorescens*, 891
Aislamientos de *R. solani*, 184
Aislamientos de SfNPV, 386
Aislamientos de *Trichoderma harzianum*, 863
Aislamientos de *T. harzianum*, 100, 105, 863
Aislamientos de *Trichoderma*, 863
Aislamientos de *Trichoderma asperellum*, 863
Aislamientos de *Trichoderma hamatum*, 863
Aislamientos de *Trichoderma spirale*, 863
Aislamientos de *Trichoderma* spp., 100, 197, 611
Aislamientos de *Trichoderma stromaticum*, 863
Aislamientos de *Yersinia*, 319
Aislamientos donantes, 87
Aislamientos endófitos, 864
Aislamientos hipovirulentos, 87
Aislamientos microbianos, 887
Aislamientos nativos de *L. lecanii*, 349
Aislamientos nativos de *Metarhizium* spp., 353
Aislamientos nativos de SfNPV, 386
Aislamientos nativos de *Trichoderma* spp., 184
Aislamientos patogénicos, 318
Aislamientos virulentos, 87
Alabama argillacea, 323, 493
Alabama sp., 490
Alarma, feromonas de, 414
Aleurocanthus woglumi, 499
Aleuroctonus vittatus, 496, 499
Aleurodicus sp., 496, 499
Aleurothrixus floccosus, 496, 499
A. floccosus, 496
Aleurotrachelus socialis, 495, 496, 498
A. socialis, 496-499
Alfalfa mosaic virus, 93
AMV, 93, 94
Alfamovirus, 94
Allograpta (*Fazia*) CR-2 aff. *Hians*, 462, 520
Alomonas, 414
Alpha flexiviridae, 87
Alternaria, 78, 95, 99, 231, 238, 658, 995
A. alternata, 232-234, 997
Alternaria brassicae, 966
Alternaria destruens, 767
Alternaria solani, 81, 857, 906
Alternaria sp., 70, 85, 114, 115, 997
Alysia sp., 500, 502
Amblydromalus manihoti, 469, 470
A. manihoti, 469
Amblydromalus rapax, 469
Amblyseius aerialis, 470
Amblyseius herbicolus, 461
Amblyseius sp., 729
Ambracius daufouri, 461
Aminopeptidasas, 308
Amitus fuscipennis, 490, 495, 496, 613
A. fuscipennis, 495, 497-499
Amitus spiniferus, 496
Amitus macgowni, 496, 498
A. macgowni, 499
Ampelomyces quisqualis, 71, 81, 98, 114, 115
A. quisqualis, 81, 98

Anagyrus kamali, 464
Análisis de prefactibilidad, 632
Anastrepha coronilli, 501, 504
Anastrepha distincta, 501, 504
Anastrepha fraterculus, 501, 504
A. fraterculus, 504, 505
Anastrepha leptozona, 501, 504
A. leptozona, 504
Anastrepha ludens, 424
A. ludens, 504, 506
Anastrepha nuneze, 501, 504
Anastrepha obliqua, 501, 504
A. obliqua, 504, 505
Anastrepha ornata, 501, 504
Anastrepha pickeli, 501, 504
A. pickeli, 504
Anastrepha, 501, 504
Anastrepha spp., 490, 505
Anastrepha striata, 501, 504, 505, 999
A. striata, 504, 505
Androctonus australis, 400, 935
Annona muricata, 464
Anomala cuprea, 307, 391
Anovia punica, 458, 460, 466, 468, 1043
A. punica, 460, 466-468, 1043
Anthonomus grandis, 306, 307, 344, 417, 424-426, 428, 430, 434, 867
A. grandis, 430, 434
Antibiosis, 72, 94, 96, 98, 104, 150, 159, 160-162, 170, 238, 267, 268, 603, 856, 863, 870, 882, 901, 902
Anticarsia sp., 490
Antósfera, 73, 261
Antracnosis, 65, 66, 79, 84, 86, 99, 110, 112, 224, 226, 232-234, 808
Apanteles congregatus, 508
Aphelinus mali, 489
Aphidius colemani, 737
Aphidius ervi, 861
Aphidoletes aphidimyza, 460
A. aphidimyza, 460
Aphis gossypii, 459, 460
Apis mellifera, 416
Apresorio, 62, 64, 97, 163, 173, 341, 342, 638, 866, 937, 973
Aproaerema modicella, 884
Aprostocerus sp., 511
Arabidopsis thaliana, 85, 101, 195, 265, 268, 805, 902, 955, 977, 994, 1003
A. thaliana, 967, 995, 997
Arawana sp., 463
Argonauta, 906, 907
ARN interferente, 709, 906, 907, 929, 930
ARNi, 880, 905, 906, 908, 929-932, 943
ARN satélite, 90
Arthrobotrys irregularis, 768
Aschersonia spp., 859
Ascoviridae, 374, 376, 938
Asobora anastrephae, 502
Aspergillus citricus, 163
Aspidiotus destructor, 467
A. destructor, 467
Athelia bombacina, 82
ATP binding cassette, 308
ABC, 308
Atrazina, 885
Attract and kill, 1002
Attracticide, 991, 1002
Aureobasidium pullulans, 75, 115, 116, 232, 240, 243, 274
A. pullulans, 240, 241
Aureobasidium sp., 71, 75
Auricílicas, sensilias, 418
Autographa californica, 389, 931, 935, 939
Autographa nigrisigna, 391
Autolisis, 153, 305
Autoridades regulatorias, 679, 699, 703, 704
Axion sp., 463
Axonopus sp., 1043
Azospirillum spp., 153
Azotobacter chroococcum, 786
Azya orbigera, 462, 463, 519

B

β-aminobutírico, 804, 805
β-antiparalelas, 305,
β-cariofileno, 436, 437

Bacillus amyloliquefaciens, 86, 99, 112, 116, 179, 181, 183, 189, 190, 233, 640, 647, 668, 777

B. amyloliquefaciens, 99, 101, 160, 164, 166-169, 171, 240, 640, 674, 675, 904, 994

Bacillus brevis, 78, 100, 101

Bacillus cereus, 85, 767, 996

B. cereus, 101, 164, 310

Bacillus firmus, 189, 768

Bacillus licheniformis, 85, 179, 182, 189, 232, 884, 934

B. licheniformis, 99, 164, 884

Bacillus pumilus, 85, 113, 116, 179, 181, 182, 189, 190, 191, 768, 774, 884

B. pumilus, 86, 99, 164, 996

Bacillus sotto, 301

Bacillus sp., 74, 110, 161, 314, 884, 889, 891

Bacillus sphaericus 300, 315, 660, 700, 768, 776

Bacillus subtilis, 78, 85, 110, 112, 116, 166, 179, 181-183, 189, 191, 230, 232, 238, 635, 647, 658, 668, 671, 700, 710, 768, 774, 775, 883, 884, 889, 994

B. subtilis, 85, 86, 99, 110, 164, 181, 238, 240, 241, 300, 883, 994, 996, 997

Bacillus thuringiensis 48, 89, 298, 299, 300-305, 309, 312, 313, 323, 355, 602, 635, 638, 639, 653, 668, 700, 708, 767, 768, 771, 772, 774, 776, 777, 802, 933, 934, 937

B. thuringiensis, 301, 302, 307, 308, 310, 315, 322, 639, 640, 655, 660, 934, 937, 938

Bacillus thuringiensis subespecie *kurstaki*, 777

B. thuringiensis ssp. *morrisoni* var. *Thuringiensis*, 938

Bacterias entomopatogénicas, 302

Bacteriófagos, 151, 398, 880, 891, 892, 893

Bactrocera dorsalis, 424, 426, 969, 1002

B. dorsalis, 930

Bactrocera spp., 442

Bactrocera tryoni, 909

Baculoviridae, 374, 377, 378, 385, 938, 964

Baculovirus erinnyis, 1047

Banana Bunchy Top Virus, 891

BBTV, 891

Basicónicas, sensilias, 418

Beauveria bassiana, 48, 89, 340, 345, 354, 355, 358, 373, 511, 520, 603, 638, 639, 641, 646, 647, 650, 652-654, 668, 700, 702, 768, 772, 775, 841, 842, 858, 859, 861, 867, 933, 936, 1000, 1043

B. bassiana, 343, 344, 346-349, 354, 359, 360, 527, 528, 613, 655, 710, 858, 859, 861, 862, 867, 868, 884, 936-938, 975

Beauveria brongniartii, 345, 355, 938

B. brongniartii, 346, 354

Beauveria pseudobassiana, 928

Beauveria sp., 635

Begomovirus, 348, 495, 1020

Bellucia axinanthera, 502

Bellucia pentamera, 502

Bemisia argentifolii, 472

Bemisia tabaci, 344, 348, 472, 495-497, 610, 612, 639, 641, 648, 649, 704, 705, 859, 1020

B. tabaci, 348-352, 360, 472-474, 495, 497, 499, 610, 612, 613, 930

Bemisia tuberculata, 498

B. tuberculata, 498, 499

Billaea claripalpis, 490, 513, 515

B. claripalpis, 514, 516

Biocontrol

Biocontrol de enfermedades, 263

Biocontrol, actividad de, 101

Biocontrol, agente de, 49, 50, 51, 82, 104-106, 150, 156, 158, 159, 162, 177, 191, 202, 203, 246, 277-279, 284, 394, 598, 603, 640, 658, 671, 707, 710, 764, 766-770, 772, 777-779, 780-782, 790, 880, 882, 896, 963, 974, 975, 980

Biocontrol, cadena de, 106

Biocontrol, mecanismos de, 175

Biocontrol, organismos de, 50, 354

Biocontrolador

Biocontrolador, agente, 84, 163, 339, 639, 655-658, 723, 970

Biocontrolador, efecto, 79, 100, 171, 187, 274, 598, 640, 883, 996

Biocontrolador, hongo, 48, 200, 274, 354, 355, 356, 603, 606, 671, 860, 928

Biocontrolador, inóculo, 82

Biocontrolador, microorganismo, 50, 117, 118, 183, 600, 602, 603, 609, 641, 647, 652, 654, 656-658, 681, 696

Biocontroladora, actividad, 49, 79, 82, 84, 94, 104, 105, 107, 108, 117, 118, 156, 162, 176, 189, 197, 200, 202, 224, 236, 240, 245, 278, 349, 353, 383, 390

Biocontroladoras, bacterias, 101, 162, 175, 238, 279

Biocontroladoras, cepas, 276

Biocontroladoras, levaduras, 237, 244

Biocontroladores bacterianos, 112

Biocontroladores registrados en Colombia, 185

Biocontroladores, agentes, 51, 52, 61, 71, 72, 78, 244, 267, 268, 273, 276, 603, 660, 734, 806, 889, 901, 902, 975

Biocontroladores, hongos, 84, 85, 99, 162, 635, 643, 671, 705, 927, 928

Biocontroladores, hongos filamentosos, 114

Biocontroladores, microorganismos, 61, 118, 148, 183, 190, 235, 277, 284, 600, 608, 609, 617, 638, 640, 645, 647, 654, 658, 669, 672, 681, 767, 802, 880, 884, 886, 889, 896, 899, 909, 977, 978

Bioensayo, 105, 110, 151, 242, 347, 601-608, 611, 613, 614, 618, 632, 634, 641, 656, 657, 671, 703, 744, 746-750, 752, 753, 894, 934, 995, 996

Bioinformática, 872, 955, 960-963, 965, 966, 968-970, 974, 979, 980

Bioinsecticida, 301, 302, 325, 343, 347, 361, 370, 376, 381, 383, 388, 395, 397, 400, 638, 645, 665, 704, 767, 783, 785, 866-868, 924

Bioinsumo, 284, 352, 384, 386, 387, 399, 431, 634, 655, 659, 662, 679, 694, 695, 702, 703, 704, 705, 735, 739, 773, 780, 882, 927

Bioinsumo de uso agrícola, 431

Biomasa

Biomasa de la levadura, 667

Biomasa de microorganismos biocontroladores, 638

Biomasa de plantas, 79

Biomasa fúngica, 637, 888

Biomasa hifal, 673

Biomasa microbiana, 642, 897

Biomasa microbiana total, 801

Biomasa seca, 107, 674

Biomasa terrestre total, 800

Biomasa total de microorganismos, 268, 901

Biomasa, producción de, 107, 110, 518, 637, 667, 674, 857, 858, 994

Bioplaguicida, 50, 60, 61, 79, 82, 84, 97, 98, 104-106, 108, 110-115, 117, 118, 146, 148, 149, 162, 165, 175, 178, 180-183, 186, 187, 189, 192, 197, 200-202, 229, 230, 243-245, 247, 274-276, 298, 300, 301, 319, 321, 322, 324, 325, 336, 341, 343, 345, 346, 349, 350, 351, 353, 354, 356, 358, 370, 381, 383, 384, 386, 387, 389-392, 400, 427, 507, 596, 598-602, 604, 608, 609-613, 615, 617, 619-630, 632-637, 639-648, 654, 655-662, 665, 667-669, 676-681, 694-701, 703-711, 764, 766-774, 778, 780-788, 790, 802, 804, 806, 812, 836, 866, 867, 880, 882, 884, 885, 887, 893, 904, 924, 932-934, 936, 943, 969

Biopolímeros, 754, 898

Biosteres longicaudatu, 505

Biótrofo, 62-65, 72, 94-96, 99, 195, 617

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), 311

Blasticidin, 93

Blumeria graminis, 62, 117, 617, 857

B. graminis, 64, 617, 618

Boerhavia diffusa, 92, 93

B. diffusa, 93

Bombyx mori, 301, 307, 390, 415, 416, 746, 748, 930, 939

B. mori, 391, 939

Botryocidas, 61

Botryotinia fuckeliana, 62

Botrytis fabae, 71, 100

Botrytis sp., 103, 114

Bougainvillea spectabilis, 92

Brachiacantha decora, 463

Bradyrhizobium japonicum, 181, 786,

Brevibacillus laterosporus, 85

Burkholderia sp., 321

Bursaphelenchus cocophilus, 431, 785

C

Cacao swollen-shoot virus, 90

Caderinas, 308

Caenorhabditis elegans, 906, 929, 955

C. elegans, 955, 967

Cairomonas, 414, 422, 423, 427, 437

Cambio climático, 45, 264, 779, 802, 812, 926, 1016, 1019-1021, 1023-1029, 1036, 1038-1041, 1044-1047, 1049-1051

Campomanesia lineatifolia, 502

Camponotus, 464

Candida guilliermondii, 84, 233

Candida oleophila, 84, 114, 116, 230, 233, 241, 243, 244, 245, 769

C. oleophila, 236, 245

Candida spp., 71, 75

Candidatus Liberibacter asiaticus, 69, 518, 519

Capnodium sp., 348, 461, 495
Capsicum sp., 460, 463
Carpósfera, 73, 230, 231, 261, 265, 267, 899, 901
Cationic cell-penetrating peptide, 932
Caulimovirus, 94
Caulósfera, 73
Celocónicas, sensilias, 418
Cephalonomia stephanoderis, 490, 520, 521
C. stephanoderis, 521-523, 526-528
Ceraeochrysa cincta, 737
Ceraeochrysa claveri, 737
Ceraeochrysa sp., 461, 463, 520
Ceratitis, 1002
Ceratitis capitata, 424, 426, 435, 440, 505, 999
C. capitata, 435, 1002
Ceratocystis ulmi, 862
Cercospora arachidicola, 71
Cercospora beticola, 85
Cereus, 311
Chaetomium globosum, 82
Cheilomenes sexmaculata, 462, 519
C. sexmaculata, 462, 463
Chenopodium ambrosioides, 774
Chetogena scutellaris, 508
Chilo sacchariphagus, 516
Chilo suppressalis, 394, 426
C. suppressalis, 426
Chilocorus cf. *cacti*, 462
Chondrostereum purpureum, 113, 767
Choristoneura fumiferana, 939, 941
C. fumiferana, 426, 941
Chromobacterium spp., 75, 320
Chromobacterium subtsugae, 320, 775
C. subtsugae, 320
Chrysomphalus aonidum, 467
Chrysomphalus ficus, 467
Chrysopa sp., 460, 461
Chrysoperla carnea, 460, 461, 737
C. carnea, 461
Chrysoperla externa, 1050
Chrysoperla rufilabris,
C. rufilabris, 461
Chrysophyllum cainito, 502
Ciclo adaptativo, 824, 834, 835
Citocromo, 173, 930
Citrus aurantifolia, 510
Citrus limon, 466
Citrus nobilis, 510
Citrus reticulata, 510
Citrus spp., 465, 520
Citrus tristeza virus, 90, 91
Cladosporium cladosporioides, 78, 82
Cladosporium herbarum, 78
Cladosporium spp., 75, 231
Clavibacter michiganensis, 69
Clerodendrum aculeatum, 92
Clonostachys rosea, 82, 85, 179, 180, 858
C. rosea, 82
Coccinella septempunctata, 1000, 1001
Cochinilla acanalada de Colombia, 456, 458-460, 463, 464, 466, 1036, 1041
CAC, 464, 1041
Cochliobolus heterostrophus, 45, 997
Cochliobolus miyabeanus, 45
Cochliobolus sativus, 857, 995, 996
C. sativus, 857
Coffea arabica, 502, 503, 505
Colletotrichum sp., 857, 863
Colletotrichum capsici, 72, 100, 234
Colletotrichum gloeosporioides, 65, 84, 86, 110, 767
C. gloeosporioides, 66, 82, 100, 112, 228, 232, 233, 234, 236, 240, 997
Colletotrichum sp., 857, 863
Colletotrichum tropicale, 863, 864
Competencia, 95, 104, 112, 264, 265, 268, 324, 677, 856, 882
Competencia contra hongos fitopatógenos, 163
Competencia de agentes microbianos, 94
Competencia por espacio, 73, 94, 98, 114, 150, 161, 162, 170, 199, 238, 242, 246, 267, 608, 658, 901
Competencia por nichos, 113, 857
Competencia por nutrientes, 71, 94-96, 98, 102, 114, 150, 161, 162, 170, 199, 238, 242, 246, 267, 658, 857, 901, 975
Competencia por sustrato, 95, 863
Competencia rizosférica, 156, 172

Complejo
Complejo de silenciamiento, 906
Complejo macroglomerular, 419, 420
Compsus obliquatus, 510
Compsus viridivittatus, 509, 510, 531
C. viridivittatus, 509-512
Compuestos volátiles orgánicos, 990, 992
voc, 74, 161, 436, 856, 857, 860, 885, 992, 997, 998, 1004
mVOC, 74, 990-1005
Coniothyrium minitans, 161, 162, 193, 637, 668
C. minitans, 162, 163
Conotrachelus psidii, 436
C. psidii, 436, 437
Contacto, feromonas de, 418
Control
Control de calidad, 347, 396, 397, 499, 630, 634, 648, 649, 650, 651, 655, 656, 657, 671, 677, 696, 698, 703, 709, 735, 962
Control natural, 348, 460, 461, 500, 769, 828, 832, 833
Control químico, 46, 50, 71, 78, 106, 110, 184, 200, 201, 424, 426, 433, 461, 465, 518, 730, 732, 737, 738, 739, 788, 799, 811, 832, 839, 841, 863, 891, 894, 932
Control sostenible, 474, 824, 826, 841, 1003, 1004
Control biológico
Control biológico aumentativo, 49, 456, 474-477, 734
Control biológico clásico, 49, 50, 456, 458-460, 463, 465, 468, 469, 471, 475, 477, 488, 489, 491, 520, 529
Control biológico de ácaros, 720, 733
Control biológico de conservación, 49, 456, 530, 812
Control biológico de fitopatógenos, 47, 61, 74, 78, 85, 86, 118, 146, 148, 149, 151, 152, 161, 162, 164, 175, 176, 200, 258, 611, 803, 856, 882, 889, 896, 902, 971, 974, 975
Control biológico de inoculación, 49, 50
Control biológico de insectos, 89, 338, 357, 376, 456, 701, 858, 926, 977
Control biológico de plagas, 47, 458, 459, 471, 474, 477, 488, 493-495, 680, 718, 720, 734, 737, 933, 943, 1047
Control biológico inundativo, 50, 488, 490, 493
Control biológico por conservación, 456, 474, 475
Coptera haywardi, 506
Corynespora cassiicola, 70
Cosmopolites sordidus, 345, 423, 426, 438, 440, 858
Costos
Costos fijos, 677, 783
Costos variables, 677
Cotesia congregata, 508, 941
Cotesia flavipes, 490, 516, 517
C. flavipes, 516, 517
Cotesia sp., 771
Crematogaster, 460, 464
Crinivirus, 495
Cristal parasporal, 304, 305, 308, 311, 315
Cristales proteicos, 301, 302
Cryphonectria parasitica, 79
C. parasitica, 86
Cryphonectria, 79, 86
Crypticerya brasiliensis, 463
Crypticerya genistae, 463
C. genistae, 463, 466
Crypticerya montserratensis, 468
C. montserratensis, 465, 466
Crypticerya multicicatrices, 456, 457, 460, 463, 464, 1041
C. multicicatrices, 460, 464-468
Crypticerya sp., 464
Cryptococcus albidus, 84, 101, 233, 243
Cryptococcus sp., 71
Cryptognatha auriculata, 466, 467
C. auriculata, 467, 468
Cryptognatha spp., 462
Cryptolaemus sp., 462
Cryptophlebia leucotreta, 379
Cucumber mosaic virus, 90, 91, 890
CMV, 87, 90, 93, 94, 890
Cucumis melo, 499
Cuernos laterales, 415, 419, 420
Cuerpo de inclusión, 372, 374-377, 391, 934
Cuerpos fungiformes, 415, 419, 420
Curinus colombianus, 462, 519
Curvularia eragrostidis, 70
Cycloneda sanguinea, 462, 519
C. sanguinea, 463

Cydia pomonella, 387, 389, 397, 423, 424, 426-428, 440, 660, 769, 783, 866, 1001
C. pomonella, 395, 426
Cydia sp., 490
Cypovirus, 372, 375, 382, 393

D

Dacnusa sibirica, 776
Damping off, 805, 928
Daño
Daño, intensidad de, 829, 830
Daño económico, umbral de, 433, 826, 828
Dasiops caustonae, 501, 504
Dasiops gracilis, 501, 504
Dasiops inedulis, 501, 504
D. inedulis, 505
Dasiops spp., 490
Dasiops yepezi, 501, 504, 505
Delphastus catalinae, 471, 472, 776
D. catalinae, 472-474
Delphastus pusillus, 613
Delphastus quinculus, 465
D. quinculus, 465
D-endotoxina, 709
Dendroctonus spp., 1041
Diabrotica virgifera virgifera, 440, 930
D. virgifera virgifera, 930
Diacetilfloroglucinol, 2,4-, 99, 175, 176
DAPG, 175-177
Diachasmimorpha longicaudata, 505, 506
D. longicaudata, 505
Diachasmimorpha tryoni, 505, 506
Dialeurodes citri, 496, 499
D. citri, 462, 463, 518-520, 531
Diaphorencyrtus sp., 462
Diaphorina citri, 462, 518, 519, 531, 649
D. citri, 462, 463, 518-520, 531
Diaprepes spp., 511
D. busckella, 490, 517
D. indigenella, 490, 515
Diatraea saccharalis, 438, 493, 512, 513, 771, 938
D. saccharalis, 490, 513, 515-517
Diatraea sp., spp., 490, 512, 513, 516, 517, 736
D. tabernella, 490, 517
Dicer, 906, 907, 929
Dickeya dianthicola, 1039
dideoxiNTPs, 961
Diomus seminulus, 465
D. seminulus, 465
Diomus sp., 462
Dióxido de carbono, 153, 1038
Dirhinus giffardi, 505, 506
Diseño
Diseño central compuesto, 665, 667
Diseño de experimentos, 636, 637
DOE, 636, 665
Diseño de medios de cultivo, 635, 639
Diseño de Plackett Burman, 636, 637, 644
Diseño factorial, 637, 640, 643, 665, 667
Diseños Box-Behnken, 637, 665, 667
Diseños de cribado, 636
Diseños de Taguchi, 636, 666, 668
Dispersantes, 643
Diversidad
Biodiversidad, 46, 75, 76, 260, 718, 734, 796, 800, 801, 824, 836, 837, 840, 841, 843, 852, 855, 863, 885, 926, 1003, 1050, 1051
Diversidad bacteriana, 279, 280
Diversidad biológica, 152, 475, 734, 836, 838, 890, 895
Diversidad botánica, 796, 799, 806
Diversidad de especies, 72, 77, 505, 530, 807
Diversidad de hongos, 273
Diversidad de microorganismos, 70, 76, 77, 260, 268, 1003
Diversidad de parasitoides, 477, 530
Diversidad fúngica, 267, 901
Diversidad genética, 201, 265, 276, 398, 400, 806, 807
Diversidad microbiana, 75, 266, 273, 274, 279, 298, 796, 882, 900
Diversidad molecular, 265, 899
Doryctobracon areolatus, 500, 502, 504, 506
D. areolatus, 504
Doryctobracon crawfordi, 500, 502, 504, 506
Doryctobracon trinidadensis, 500, 502

Doryctobracon zeteki, 500, 502
Dosis
Dosis de aplicación, 50, 79, 383, 705, 708
Dosis letal media, 318, 319, 320
Dosis mínima efectiva, 660, 661
Drosophila melanogaster, 321, 415, 906, 930, 955, 1000
D. melanogaster, 321
Drosophila spp., 859
Drosophila suzukii, 440, 1002
Duración del registro, 699, 703
Dynamis borassi, 431, 435
D. borassi, 431

E

Earias vittella, 938
Eficacia
Eficacia biológica, 377, 398, 660, 662, 942
El niño, fenómeno de, 1023, 1039, 1045
Elaeis guineensis, 430, 436
E. guineensis, 436
Elasmopalpus sp., 490
Elicitor, 174, 177, 805, 806, 880, 881, 899, 902-904, 909
Embedded viruses, 939
Encarsia aleurothrixi, 496
Encarsia bascinta, 496
Encarsia bellotti, 496
E. bellotti, 498, 499
Encarsia citrella, 496
Encarsia formosa, 490, 496, 498, 737, 776, 837
E. formosa, 498, 499
Encarsia grupo *luteola*, 496, 498
Encarsia hispida, 496
E. hispida, 498, 499
Encarsia luteola, 496
Encarsia mineoi, 497
Encarsia nigricephala, 497
Encarsia pergandiella, 497, 498
Encarsia sophia, 497
E. sophia, 498, 499
Encarsia sp., spp., 497, 498, 499
Encarsia strenua, 497
Endófitos
Endófitos clavicipitáceos, 854, 862
Endófitos no clavicipitáceos, 854, 855
Endófitos, hongos, 271, 852, 854-856, 858, 860, 862-866, 871, 872, 896
Endófitos, microorganismos, 709, 710, 852, 855, 856, 858, 860, 862-865, 869-872
Endósfera, 70, 73, 260, 265, 899
Enemigos naturales, 42, 47, 49, 72, 105, 376, 388, 424, 458, 461-463, 465, 466, 469, 471, 474-477, 489, 500, 505, 507, 509, 511-513, 518, 519, 523, 528, 530, 613, 659, 660, 700, 709, 710, 718, 720, 727, 734-739, 778, 779, 783, 812, 827, 828, 839, 841, 860, 861, 935, 968, 1038, 1041, 1042, 1045, 1047, 1048, 1050
Enhancina, 391, 934, 940, 942
Entomófagos, 1039
Entomógeno, 338
Entomopatógenos
Entomopatógeno, hongo, 48, 89, 98, 336, 338, 340-346, 348, 356-362, 388, 458, 511, 606, 635, 637-639, 647, 652, 654, 704, 710, 786, 858, 859, 862, 867, 870, 927, 933, 936, 937, 1000, 1039, 1043
Entomopatógeno, microorganismo, 458, 603, 609, 655, 924, 934, 936
Entomopatógeno, virus, 373, 374, 390, 392, 395, 396, 400, 607, 617, 647, 652, 933, 938, 941, 942
Enzimas degradadoras
Enzimas degradadoras de feromonas, 418
PDE, 418
Enzimas degradadoras de odorantes, 418
ODE, 418
Epicloë festucae, 859
Epicloë spp., 858
Epidemiología, 61, 319, 435, 799, 809, 1016, 1025, 1026, 1027
Epidinocarsis (Apoanagyrus) diversicornis, 528
E. diversicornis, 529
Epinotia aporema, 392
Epitelio, 302, 308, 315, 317, 377, 379, 419
Epizootia, 319, 339, 340, 341, 343, 347, 373, 399
Era posgenómica, 961, 962, 968, 978
Eretmocerus eremicus, 737, 776
Eretmocerus sp., spp., 497, 498, 499
Erinnyis ello, 380, 386, 507, 508, 651, 1047
E. ello, 386, 507-509, 1048

Erinnyis sp., 490
Eriobotrya japonica, 502
Eriosoma lanigerum, 489
Erwinia amylovora, 69, 72, 113, 115, 117, 894
E. amylovora, 70, 113
Erwinia spp., 75
Erysiphe cichoracearum, 66, 70, 112
Erysiphe necator, 66, 81
Erysiphe orontii, 85
Erysiphe spp., 66, 112
Escalamiento
Escalamiento piloto, 599, 630, 633, 665
Escape de enfermedades, 1027
Esclerocio, 63, 97, 98, 160, 162, 163, 184-186, 188-191, 193, 194, 600, 604, 611, 612, 615, 809, 924, 927, 974
Estabilidad
Estabilidad de bioplaguicidas, 657
Estabilidad electrostática, 643
Estudio
Estudio de prefactibilidad, 364
Estudios de eficacia, 657, 658, 659
Estudios toxicológicos, 105, 230, 607
Euderomphale sp., 497, 498
Eulophus pennicornis, 935
Euphorocera scutellaris, 508
Euseius concordis, 470
Excipientes, 324, 353, 641, 643-646, 676
Exochomus marginipennis, 463
Exosporium, 304
Extremo
Extremo C-terminal, 308
Extremo N-terminal, 308

F

Factor sinérgico de la infección viral, 391
Factoriales
Factoriales fraccionados, 636, 666
Factoriales irregulares, 636
Factoriales irregulares mixtos, 636
Feijoa sellowiana, 502
Fenazinas, 99, 176
Fengicinas, 99, 114, 165, 166, 168, 169, 171, 903
Fermentación
Fermentación bifásica, 356, 640, 926
Fermentacion líquida, 111, 347, 357, 637, 638, 639, 640, 649, 671, 929, 928
Fermentación sólida, 357, 637, 638, 640, 648-650, 672, 674, 926
Feromonas
Feromonas de contacto, 418
Feromonas de reclutamiento, 414
Feromonas de territorialidad, 414
Feromonas de trilla, 414
Feromonas sexuales, 412, 414, 421, 423, 424, 435, 492, 769
Feromonas volátiles, 418, 748
Feromona de agregación, 412, 414, 421, 423, 431, 434-437
Feromonas de alarma, 414, 756
Feromonas, enzimas degradadoras de, 418
Feromonas, proteínas ligadoras de, 418
Feromonas, receptores de, 418
Fidiobia citri, 511
Fidiobia dominica, 511, 512
Fidiobia sp., 509, 511, 512
Filoplano, 73, 77, 84
Filósfera, 61, 62, 70-78, 82-85, 95, 100, 108, 110, 114, 159, 175, 231, 261, 265-267, 611, 870, 893, 899-901, 1004
Firmicutes, 85, 272, 300
Fitoestimulador, 148, 884
Fitopatógenos
Fitopatógenos, hongos, 62, 74, 95, 114, 160, 163, 165, 169, 647, 862, 927, 933, 959, 970, 972, 976, 995-997
Fitopatógenas, bacterias, 61, 62, 69, 74, 152, 169, 880, 891-894, 905
Fitopatógenos, control de, 72, 96, 98, 104, 112, 117, 158, 169, 180, 197, 199, 245, 602, 603, 642, 648, 674, 858, 884, 885, 905, 929, 970, 971, 974, 976, 997
Fitopatógenos, control biológico de, 47, 61, 74, 78, 85, 86, 118, 146, 148, 149, 151, 152, 161, 162, 164, 175, 176, 200, 258, 611, 803, 856, 882, 889, 896, 902, 971, 974, 975
Fitopatógenos foliales, 60, 61, 78, 86, 94, 104, 112, 117, 118

Fitopatógenos del suelo, 146, 148, 149, 152, 161-164, 168, 175-177, 180, 182, 197, 200, 997
Fitovirus, 92, 93
Flacheria, 301
Flagelina, 310, 311, 903
Flagelo, 69, 70, 85, 156, 176, 310
Floroglucinoles, 99
Fomes fomentarius, 92
Fosfolípidos, 115, 167, 359
Fostasas alcalinas, 308
Frankliniella occidentalis, 460, 867
F. occidentalis, 460
Fulvia fulva, 79, 85
Fungifree AB®, 110
Fusariosis, 151, 1021-1023
Fusarium culmorum, 857, 995, 996
F. culmorum, 857
Fusarium graminearum, 62, 117, 149, 908
F. graminearum, 63, 64
Fusarium head blight, 1021
Fusarium oxysporum, 106, 150, 177, 182, 183, 192, 196, 201, 272, 281, 282, 285, 603, 610, 648, 679, 702, 806, 808, 809, 857, 883, 889, 904, 955
F. oxysporum, 150, 151, 158, 160, 161, 166, 167, 169, 171, 180, 182, 192, 195, 197, 199, 200, 612, 615, 640, 861, 898, 997
F. oxysporum f. sp. *radicis-lycopersici*, 196, 282, 857
Fusarium sp., spp., 78, 163, 180-183, 224, 226, 228, 243, 617, 648, 862, 887, 1028
Fusarium verticillioides, 888

G

Gaeumannomyces graminis, 99, 149, 151, 175, 887
Galanthus nivalis, 935
Galendromus annectens, 470
Galleria mellonella, 382
G. mellonella, 319, 321
Galleria mellonella NPV, 395
Gamma flexiviridae, 87
Genea jaynesi, 514, 515
G. jaynesi, 515
Genes *pif*, 939
Gibberella zeae, 63
Gliocladium catenulatum, 82, 114, 115, 179, 180, 183
Gliocladium roseum, 82, 85
Gliocladium sp., spp., 71, 183
Glomerella, 64, 75, 233
Glomérulos, 419, 420
Glossina fuscipes fuscipes, 426
Glycerol facilitator, 311
Gossypium hirsutum, 430, 434
Gracilicutes, 300
Grados
Grados día broca, 1044
Grados día cafeto, 1044
Gram
Gram negativa(o), 69, 70, 298, 299, 300, 311, 316, 319, 321, 519
Gram positiva(o), 85, 86, 298-300, 302, 311
Granulovirus
Granulovirus de *Cydia pomonella*, 387, 397, 783
Granulovirus de la polilla de la manzana *Cydia pomonella*, 769
CpGV, 381, 387, 389, 397, 398, 769, 783
Granulovirus de *Epinotia aporema*, 392
Granulovirus de *Erinnyis ello*, 386
Granulovirus de *Harrisia brillians*, 379
Granulovirus de *P. unipuncta*, 941
Granulovirus de *Phthorimaea operculella*, 383, 786
Granulovirus *Tuta absoluta*, 651
Granulovirus de *Xestia c-nigrum*, 391
Grapholita molesta, 389, 425, 426, 428, 440
Grupos de compatibilidad vegetativa, 86, 87
Gymnandrosoma aurantianum, 444
Gyranusoidea indica, 464

H

Hadrotrichodes sp., 511
Haeckeliana sp., 511
Haematobia irritans, 490, 1000
Haemophilus influenzae, 955
Harmonia axyridis, 462, 520
Helper component protein, 90
HC-Pro, 90

Heilipus lauri, 436
H. lauri, 437
Helicoverpa armigera, 306, 389, 391, 440, 603, 701, 771, 861, 930, 935
H. armigera, 317, 392, 400, 861, 868, 941
Helicoverpa zea, 308, 316, 389
H. zea, 389
Helicoverpa zea nucleopolyhedrovirus, 381
Helicoverpa zea NPV, 395
Heliothis spp., 354, 490, 493, 494, 701, 772
Heliothis virescens, 306, 323, 389, 931
H. virescens, 321, 389
Heliothis zea, 428
H. zea, 389
Helminthosporium sativum, 149
H. sativum, 150
Helminthosporium victoriae, 150, 151
Hemibiótrofo, 62, 64, 195
Hemileia vastatrix, 68, 98, 522
Hemocele, 298, 317, 319-321, 341, 342, 382, 866, 931, 939
Hemolinfa, 302, 308, 314, 315, 342, 372, 376, 380, 382, 460, 521, 935, 936
Heterorhabditis bacteriophora, 774, 776
Heterorhabditis sp., 511
Hexafluoruro de azufre, 1038
Hidrofluorocarbonos, 1038
Hidrolizados de proteínas, 896, 897
Hifa infecciosa, 62
Hiperparasitismo, 94, 100, 114, 161, 508, 603
Hipovirus Cryphonectria, 86
Hippodamia convergens, 459, 462, 521
Hirsutella spp., 859
Holobionte, 260, 274, 275, 802
Holobus, 469
Hongos
Hongos clavicipitáceos, 854
Hongos entomopatógenos, 48, 89, 98, 336, 338, 340-346, 348, 356-362, 388, 458, 511, 606, 635, 637-639, 647, 652, 654, 704, 710, 786, 858, 859, 862, 867, 870, 927, 933, 936, 937, 1000, 1039, 1043
House keeping genes, 311
Huanglongbing, 462, 463, 518
Hyaloperonospora arabidopsidis, 805
Hylobius abietis, 617
Hyperaspis sp., 461
Hypoaspis miles, 460
Hypothenemus hampei, 307, 346, 440, 520, 522, 702, 772, 841, 858, 1044, 1045, 1048, 1049
H. hampei, 346-348, 359, 520-522, 524, 525, 527, 1045-1047

I

Icerya brasiliensis, 464
Icerya purchasi, 458, 459, 463, 468, 489
I. purchasi, 458
Identificación por secuenciación multilocus, 311
MLST, 311
Idnoreovirus, 375, 382
Illumina, 273, 955, 956, 957, 961, 962
Incubación, 109, 167, 236, 396, 600, 604, 605, 607, 637, 647, 864, 868, 888, 972
Inducción de resistencia, 93, 94, 100-102, 114, 159, 163, 176, 197, 237, 241, 279, 804, 806, 852, 856, 858, 871, 883, 885
Infectividad, 382, 390, 391, 392, 394, 395, 697, 939
Inga edulis, 503
Ingeniería genética, 61, 94, 392, 756, 954, 968, 980
Ingrediente activo, 112, 114-116, 178-182, 300, 301, 320, 322-325, 356, 391, 427, 635, 637, 640, 641, 643-647, 655, 656, 661, 669, 671, 674, 676, 698, 699, 700, 732, 733, 778, 826, 827, 866, 867, 869, 926, 928
Inoculación
Inoculación, control biológico de, 49, 50
Insecticidas
Bioinsecticida, 301, 302, 325, 343, 347, 361, 370, 376, 381, 383, 388, 395, 397, 400, 638, 645, 665, 704, 767, 783, 785, 866-868, 924
Insectos, control biológico de, 89, 338, 357, 376, 456, 701, 858, 926, 977
Intensidad de daño, 829, 830
Inversión
Inversión de capital de riesgo, 634, 784
Inversión social, 634, 784
Ion Torrent, 955-957, 961, 962
Iphiseius degenerans, 460
Ips typographus, 426, 440
Iridoviridae, 374, 376, 964

Isaria fumosorosea, 343, 345, 355, 358, 613, 639, 647, 649, 652, 777

I. fumosorosea, 346, 349, 354

Isaria sp., spp., 343, 360, 465, 613, 859

Isla de calor, 1042

Isotermalidad, 1047

Iturina, 99, 114, 165-169, 171, 238, 240, 640

Ixodes scapularis, 928

K

Klebsiella pneumoniae, 997

Klebsiella sp., spp., 74, 75

L

Labranza mínima, 148

Lacanobia oleracea, 935

L. oleracea, 935

Lasiodiplodia theobromae, 70

Lecabiol, 349, 352, 613, 648, 678, 679, 703-705, 786

Lecanicillium lecanii, 82, 89, 98, 345, 348, 355, 610, 612, 637, 647, 648, 654, 679, 700, 704, 786, 858, 933

L. lecanii, 98, 344, 346, 349-352, 354, 360, 610, 613, 616

Lecanicillium muscarium, 345, 652, 776

Lecanicillium spp., 343, 858, 862

Leptinotarsa decemlineata, 306, 320, 938

L. decemlineata, 938

Leptopharsa gibbicarina, 460

Leucopodella sp., 462, 520

Levaduras osmofílicas, 77

Leveillula taurica, 81, 85, 112

Limoneno, 436, 437, 752, 753

Lípidos, 115, 167, 168, 229, 270, 308, 341

Lipopéptidos cíclicos, 164-166

Lisis, 94, 96, 98, 100, 166-168, 240, 242, 302, 381, 891

Lobesia botrana, 426, 428, 440

Lóbulo antenal, 418, 419

Locusta migratoria, 319, 935, 938

Lure and kill, 413, 753, 754, 1002

Lydella minense, 490, 513, 515

L. minense, 514-517

Lymantria dispar, 381, 389, 391, 395, 399, 426, 428, 440, 617, 756, 939

L. dispar, 390, 392, 940, 941

Lysinibacillus sphaericus, 300, 315

L. sphaericus, 315

M

Maconellicoccus hirsutus, 464

M. hirsutus, 464, 465

Macrolophus pygmaeus, 861

Magnaporthe oryzae, 62, 86, 117, 176, 806

M. oryzae, 62

Mahanarva sp., 771

Male annihilation, 1002

Mamestra brassicae, 391, 617, 935

M. brassicae, 392, 941

Mamestra brassicae, NPV de, 391, 392, 940

Mamestra configurata, 934

Manduca sexta, 48, 305, 306, 319, 323, 941

M. sexta, 319, 321

Manejo

Manejo convencional, 110, 273, 350-352, 781, 839

Manejo integrado de enfermedades, 200, 796, 798, 799, 809, 904

Manejo integrado de insectos plaga y de enfermedades, 695

Manejo integrado de plagas, 46, 118, 300, 325, 350, 361, 389, 390, 392, 412, 415, 424, 433, 474, 477, 493, 494, 530, 599, 613, 655, 660, 680, 700, 702, 707, 720, 744, 764, 766, 781, 798, 800, 826, 872, 882, 935, 943, 1029, 1039, 1050

MIP, 46, 114, 325, 350, 361, 424, 434, 436, 444, 474, 475, 477, 493, 599, 613, 617, 633, 645, 660, 680, 695, 707, 710, 764, 766, 769, 779, 782, 798, 799, 802, 806, 812, 813, 824, 826-828, 830, 832, 833, 836-843, 882, 1002, 1047, 1050

Mangifera indica, 464, 502-504

M. indica, 505

Manihot esculenta, 468, 498, 502

M. esculenta, 468

Marco regulatorio, 699, 700, 703, 782

Mejoramiento genético, 47, 61, 709, 801

Melampsora lini, 62

M. lini, 65

Meloidogyne spp., 768
Mesobuthus tamulus, 935
Mesocyclops longisetus, 460
Metagenómica, 261, 276, 952, 954, 955, 959
Metamasius hemipterus, 438
Metano, 1038
CH_4, 1038
Metaphycus sp., 497, 498
Metapoblaciones, 49, 1026
Metarhizium acridum, 935, 973
Metarhizium anisopliae, 339, 345, 352, 355, 358, 511, 603, 638, 647, 649, 652-654, 668, 700, 771, 774, 858, 866, 927, 933, 936, 973, 1043
M. anisopliae, 342-344, 349, 353, 354, 359, 360, 613, 647, 655, 710, 859, 867, 935-938, 973, 1043, 1045
Metarhizium brunneum, 859, 866, 927
M. brunneum, 859, 861, 866, 927, 928
Metarhizium flavoviride, 1043
M. flavoviridae, 353
Metarhizium rileyi, 48, 356, 388, 606, 649, 927, 937
M. rileyi, 349, 927
Metarhizium sp., spp., 343, 353, 355, 635, 772, 773, 859, 862, 937, 973
Methylobacterium sp., 75
Metodología de superficie de respuesta, 667
Métodos de tamizado, 880
Metschnikowia fructicola, 84, 95, 230, 231, 233, 238, 243
M. fructicola, 233, 238
Mezcla binaria, 643, 646
Micoparasitismo, 96-98, 102, 104, 115, 159, 160, 172, 186, 187, 199, 856, 862
Micovirus, 86, 87, 151
Microbiana
Microbiana, diversidad, 75, 266, 273, 274, 279, 298, 796, 882, 900
Microbiana total, biomasa, 801
Microbiano
Microbianos, volátiles, 74, 992, 993, 998, 999, 1001-1003, 1005
Microbioma, 61, 175, 176, 246, 258, 260-285, 680, 802, 803, 883, 899-902, 968, 977
Micrococcus luteus, 998
Microcrasis sp., 500, 503
Microdochium nivale, 82, 182
Microesclerocios, 164, 357, 600, 924, 926-929
Microorganismos
Microorganismos activos, 801, 808
Microorganismos epífitos, 74, 76, 864
Microorganismos promotores del crecimiento vegetal, 884
Microorganismos viables, 801
Microorganismos vivos, 706, 710, 801
Microplitis bicoloratus, 941
Microsphaeropsis ochracea, 82
Mildeo polvoso, 64, 66-68, 81, 82, 85, 86, 96, 98, 100, 102, 104, 112-115, 615, 617, 618, 857, 862
Mirafiori lettuce big-vein virus, 88, 891
MLBVV, 891
Mitogen-activated protein kinases, 173
MAPK, 172-174
Modelo de negocios, 630, 663
Monalocoris sp., 461
Monilia fructicola, 72
M. fructicola, 233, 238
Monilinia sp., spp., 115, 234, 617
Moniliophthora roreri, 81, 648, 863
M. roreri, 863
Monomorium, 464
Mononychellus tanajoa, 456, 457, 459, 468
M. tanajoa, 468-470
Mucigel, 153
Muestreo
Muestreo secuencial, 830-832
Murraya paniculata, 320
Musca domestica, 306, 425, 490, 937
Muscodor albus, 997, 998, 1001
M. albus, 997, 998, 1001
Muscodor crispans, 998
Muscodor vitigenus, 1000
Muscodor yucatanensis, 856
Mycosphaerella fijiensis, 68, 86
Mycosphaerella graminicola, 62, 117
M. graminicola, 64
Mycosphaerella spp., 70
Myrothecium verrucaria, 768, 776
Mythimna loreyi, 382
Myzus persicae, 460, 861, 935, 1001, 1039
M. persicae, 861

N

N-acil-homoserina lactona, 889, 890

Nanoemulsiones, 708

Nanoesferas, 708

Nanofibras, 708, 754, 756

Nanogeles, 708

Nanopore, 955-957

Narnaviridae, 87

Neodiprion sertifer, 381

Neoseiulus anonymus, 470

Neoseiulus barkeri, 460

Neoseiulus californicus, 470, 718, 719, 721-723, 737, 776

N. californicus, 461, 722, 723, 726, 727, 729, 730

Neoseiulus cucumeris, 460, 737

Neoseiulus idaeus, 469, 470

N. idaeus, 469

Neotyphodium spp., 858

Nepovirus, 94

Neuronas sensoriales olfativas, 418, 419

OSN, 418, 419

Next Generation Sequencing, 955

NGS, 955-957, 962, 968, 971, 979, 980

Nicotiana tabacum, 994

Nilaparvata lugens, 88, 937

Nitrógeno amoniacal, 808

NH_4, 808

Nomuraea rileyi, 344, 354, 356, 603, 647, 652, 653, 927, 937

N. rileyi, 613

Nomuraea spp., 859

Nosema bombycis, 301

Nosema locustae, 769

Nucleopoliedrovirus, 377, 378, 385, 388, 390-392, 395, 399, 607, 650, 652, 656, 931, 934, 935, 940, 968

NPV, 377, 378, 379, 382, 386, 388, 390-392, 395, 397, 400, 700, 701, 935, 939, 940, 941

NPV de *B. mori*, 391

BmNPV, 391, 939

NPV de *Mamestra brassicae*, 391, 392

MabrNPV, 391

NPV de *P. unipuncta*, 391

PuNPV, 391

O

Odontosema anastrephae, 501, 503, 506

Oídio, 64, 71, 617

Oidium lycopersici, 610, 612, 648

Oidium neolycopersici, 85

Olfacción, 415, 418

Oligota minuta, 460, 469

O. minuta, 469

Olla v-nigrum, 462, 463, 520

O. v-nigrum, 463

Olpidium virulentus, 88, 610, 612, 648, 891

Ómicas, 175, 246, 258, 264, 270, 277, 279, 899, 905, 924, 929, 930, 952, 954, 957, 961-963, 968, 969, 971, 975, 978-980

Opius bellus, 501, 503

Opius concolor, 505, 506

Opius sp., 501, 503

Olfactory receptor co-receptor, 418

ORCO, 418

Orgya pseudotsugata, 381, 389

Orius insidiosus, 460, 737

O. laevigatus, 460

O. tristicolor, 460

Ortólogos, 318, 321

Ostrinia furnacalis, 937

Óxido nitroso, 1038

N_2O, 1038

Oxyporus latemarginatus, 997

P

PacBio, 955-957, 961, 962

Pachycrepoideus vindemmiae, 490, 505, 506

Paecilomyces lilacinus, 189, 355, 356, 654, 701, 768, 774

P. lilacinus, 768

Paecilomyces sp., spp., 465, 653, 773, 859

Paecilomyces tenuipes, 89, 345

P. tenuipes, 346

Paenibacillus lentimorbus, 85

P. lentimorbus, 314

Paenibacillus polymyxa, 85, 162, 898

Paenibacillus sp., 314

Panel Intergubernamental de Cambio Climático, 1038, 1045

Pangenómica, 952, 954, 957, 959, 968
Pantoea sp., 71
Pantoea stewartii, 152, 893
Patrones moleculares asociados a patógenos, 242, 973
PAMP, 242, 973
Papaya ringspot virus, 91, 93
PRSV, 93
Papayanal, 437
Papayanol, 437
Paracasma sp., 501, 503
Parasitismo, 44, 72, 81, 97, 98, 150, 152, 162, 163, 173, 177, 191, 237, 240, 264, 268, 285, 300, 493, 497-499, 505-509, 511, 512, 514-516, 525, 527, 528, 608, 856, 863, 869, 870, 882, 902, 1047
Parásito, 47, 65, 149, 338, 339, 891
Parasitoide, 47, 300, 346, 353, 375, 376, 381, 382, 435, 458, 459, 462-464, 466, 471, 474-477, 488-531, 613, 861, 935, 941
Paratrechina, 464
Parlagena bennetti, 467
Partitiviridae, 87
Parvoviridae, 374, 382
Passiflora edulis, 503, 504
P. edulis, 505
Passiflora edulis f. flavicarpa, 503, 504
Passiflora ligularis, 503, 504, 505
Passiflora spp., 502
Passiflora tripartita var. *mollissima*, 504
Pasteuria penetrans, 768
Patogenicidad, 86, 87, 94, 101-104, 161, 195, 237, 244, 273, 274, 276, 300, 301, 316, 318, 319, 342, 346, 347, 357, 360, 384, 391, 392, 465, 601, 611, 638, 657, 697, 698, 709, 858, 866, 905, 927, 934, 940, 941, 969, 970, 975
Peanut chlorotic streak virus, 94
PCISV, 94
Pectinophora gossypiella, 306, 415, 417, 425, 426, 428, 434, 441
P. gossypiella, 426
Pectobacterium caratovorum, 889
Penicillium aurantiogriseum, 995
Penicillium charlesii, 995
Penicillium claviforme, 78
Penicillium expansum, 95, 114, 228, 238, 273, 904, 972, 975, 998
P. expansum, 95, 228, 229, 232-234, 238, 240, 243, 245, 972, 975
Penicillium glaucum, 149
Penicillium sp., spp., 71, 82, 114, 163, 224, 228, 234, 240, 243
Pentapria sp., 501, 504
Pentilia castanea, 462
Pepino mosaic virus, 891
PepMV, 891
Perfluorocarbonos, 1038
PFC, 1038
Periodo de aprobación del registro, 699
Persea americana, 436
P. americana, 92, 437
Persistencia viral, 392, 393
Pestalotiopsis theae, 70
Plant growth-promoting microorganism, 884
PGPM, 884
Phaenocarpa sp., 501, 503
Phakopsora pachyrhizi, 62
Phaseolus vulgaris, 495, 724, 858
Phenacoccus gossypii, 529
Phenacoccus herreni, 528, 529
P. herreni, 528, 529
Phenacoccus manihoti, 528
P. manihoti, 528
Phomopsis oblonga, 862
P. oblonga, 862
Photorhabdus, 298, 299, 318, 320, 321
Phthorimaea operculella, 307, 383, 389, 426, 438, 610, 614, 651, 660, 679, 786, 1001
P. operculella, 383, 384, 615
Phthorimaea operculella GV, 395
Phyllachora huberi, 82
Phyllocoptruta oleivora, 461
Phymastichus coffea, 490, 520, 524, 525
P. coffea, 521, 524-528
Physocnemum brevilinenu, 862
P. brevilinenu, 862
Phytolacca americana, 92
P. americana, 92, 437
Phytonemus pallidus, 460
Phytophthora alni, 1023

Rhagoletis cingulata, 999

Rhagoletis indifferens, 1001

Rhagoletis pomonella, 999, 1002

Rhagoletis, 1002

Rhammatocerus schistocercoides, 344, 352, 649, 1042, 1043

R. schistocercoides, 352, 353, 1043-1045

Rhizoctonia solani, 48, 71, 106, 151, 158, 163, 180-184, 192, 201, 268, 610, 611, 648, 679, 805, 809, 858, 882, 884, 887, 902, 903, 904, 928, 970, 996

R. solani, 150, 151, 160, 163, 176, 182-187, 192, 197, 200, 612, 615, 977, 997

Rhizoctonia sp., spp., 180, 181, 183, 617, 857, 862

Rhodosporidium, 84

Rhodosporidium paludigenum, 635, 668

Rhodotorula glutinis, 84, 95, 101, 108, 231, 234, 236, 238, 239, 611, 610, 649

R. glutinis, 84, 110, 111, 610

Rhodotorula minuta, 84, 110

Rhodotorula spp., 71, 75, 84

Rhynchophorol, 431, 436, 441

Rhynchophorus ferrugineus, 345, 427

Rhynchophorus palmarum, 423, 427, 431, 436, 440, 441, 785

R. palmarum, 431, 432, 786

Ricinus communis, 606

RNA-induced silencing complex, 907

RISC, 906, 907, 929

Rizobacterias, 150, 153, 156, 157, 175, 176, 804, 890

Rizobacterias promotoras del crecimiento, 161, 168, 884, 896, 994

PGPR, 150, 157, 161, 164, 168, 169, 640, 804, 884, 885, 890, 891, 903, 994

Rizodepósito, 153

Rizorremediadores, 148

Rizosfera, 70, 146, 148-150, 152-159, 161, 163, 168, 169, 172, 174-176, 186, 199, 202, 231, 260-263, 265, 266, 268, 269, 274, 277-280, 283, 658, 710, 802, 808, 859, 870, 883-885, 893, 899, 900, 902, 903, 968, 970, 992, 994, 996, 998, 1001, 1004

Rodolia cardinalis, 458, 459, 489, 1043

R. cardinalis, 459, 466, 1043

Rotación de cultivos, 188, 277, 282, 796, 799, 807-809, 882

Roya del lino, 65

S

Saturnia pyri, 415, 416

Sclerotinia homoeocarpa, 887

Sclerotinia minor, 106, 162, 193, 648, 679, 809

S. minor, 191, 192, 194

Sclerotinia sclerotiorum, 71, 74, 79, 98, 101, 105, 106, 158, 162, 180, 182, 183, 187-189, 191, 192, 201, 610, 612, 640, 648, 809, 883, 971, 996

S. sclerotiorum, 78, 81, 162, 163, 182, 190, 191, 193, 194, 200, 679, 971, 972, 974, 977, 997, 998

Sclerotinia sp., spp., 162, 180, 191, 193, 243

Sclerotinia trifoliorum, 162

Sclerotium cepivorum, 604, 610, 648

S. cepivorum, 162

Sclerotium rolfsii, 180, 809, 884

S. rolfsii, 904

Scymnus rubicundus, 462, 521

Scymnus sp., 462

Seguridad alimentaria, 45, 46, 60, 464, 530, 840, 954, 1036, 1039, 1040, 1051

Sellos de calidad, 720

Sensilias, 418, 419

Sensilias auricílicas, 418

Sensilias basicónicas, 418

Sensilias celocónicas, 418

Sensilias tricoideas, 419

Septoria tritici, 64

Serotipificación, 308, 310, 311

Serovar, 309, 310

Serovariedad, 310, 311, 313

Serratia entomophila, 298-300, 316, 317

S. entomophila, 317-319, 322

Serratia marcescens, 278, 316, 890, 934

S. marcescens, 278, 316, 324

Serratia plymuthica, 100

Serratia spp., 316, 996

Sesamia nonagrioides, 938

Sexuales, feromonas, 412, 414, 421, 423, 424, 435, 492, 769

Sideróforos, 95, 98, 113, 153, 154, 161, 175, 176, 231, 238, 885, 889, 970, 972

Signiphora aleyrodis, 499

Silba adipata, 999

Silenciamiento génico inducido por atomización, 908

SIGS, 908

Silenciamiento génico inducido por el hospedero, 906
HIGS, 906, 907, 908
Simbiosis, 44, 260, 262, 854, 869
Similitud geométrica, 670, 672, 674
Single Molecule Real Time Sequencing, 955
Single nucleotide polymorphism, 957
SNP, 957
Sinomonas, 414
Sintetasas peptídicas no ribosomales, 173
Sipha flava, 461
Sistema
Sistema inmune, 268, 321, 381, 382, 802, 805, 902, 938, 941
Sistemas adaptables, 833, 835, 836
Sistemas agrícolas, 148, 263, 274, 341, 474, 805, 812, 824, 826, 833-838, 843, 887, 954, 971, 976, 977, 1001, 1016, 1018, 1019, 1021, 1025, 1026
Sistemas complejos, 824, 826, 832-835, 1016, 1018
Sistemas SSF, 637
Sitotroga cerealella, 493
Sitotroga sp., 490
Solanum lycopersicum, 195, 197, 432, 435, 495, 860, 861, 868
S. lycopersicum, 435
Solanum tuberosum, 184, 186, 437
S. tuberosum, 186
Sorghum bicolor, 516
Sostenibilidad
Sostenibilidad agronómica, 660
Sostenibilidad ambiental, 698, 798, 813
Sostenibilidad de los sistemas agrícolas, 824, 826, 833, 838
Sostenibilidad de los sistemas de producción, 659, 660, 802, 1051
Spalangia cameroni, 490
Sphaerotheca fuliginea, 66, 79, 84, 114
S. fuliginea, 71
Sphaerotheca fusca, 66, 70, 71, 79, 98
Sphaerotheca macularis, 66, 68, 81, 112
Sphaerotheca pannosa, 82, 114
S. pannosa, 81
Sphaerotheca sp., 81
Spodoptera exigua, 306, 321, 389, 425, 429, 859, 934, 939
S. exigua, 392, 934, 940
Spodoptera frugiperda, 308, 323, 344, 380, 385, 434, 440, 606, 646, 649, 650, 660, 903, 939, 940, 968
S. frugiperda, 384-386, 392, 395, 434, 607, 613, 652, 939, 940
Spodoptera frugiperda NPV, 395
Spodoptera littoralis, 317, 389, 418, 423, 425, 753, 754, 859, 934, 977
S. littoralis, 321, 426, 934
Spodoptera litura, 390-392, 395, 429, 701, 934, 937, 940
S. litura, 386, 392, 941
Spodoptera spp., 776
Spondias mombin, 502, 503, 505
Spongospora subterranea, 610, 612, 648
Sporobolomyces roseus, 74, 95, 238
Sporobolomyces sp., 71, 972
Sporothrix spp., 850
Steinernema carpocapsae, 774, 776
Steinernema feltiae, 774, 775
Steinernema kraussei, 774
Steinernema sp., 511
Stenoma catenifer, 438
Stenotrophomonas spp., 996
Stephanoascus flocculosus, 71
Stethorus sp., 460
Stomoxys calcitrans, 490, 1000
Streptomyces coelicolor, 85, 883
Streptomyces griseoviridis, 85, 183
Streptomyces lavendulae, 85
Streptomyces lydicus, 85, 115, 116, 179, 181, 183, 774
Streptomyces platensis, 998
Streptomyces praecox, 149
Streptomyces scabies, 86, 149, 894
S. scabies, 149
Streptomyces sp., spp., 115, 116, 179, 181, 768
Surfactinas, 99, 114, 165-169, 171, 903
Swinglea glutinosa, 520
Syneura cocciphila, 465
S. cocciphila, 466

Phytophthora capsici, 98, 857, 997
Phytophthora infestans, 45, 68, 85, 1023
P. infestans, 163
Phytophthora megasperma, 92, 903
Phytophthora palmivora, 431
Phytophthora sp. spp., 81, 151, 180, 182, 183, 617, 648, 808, 863, 887
Phytoseiulus mexicanus, 470
Phytoseiulus persimilis, 460, 472, 473, 477, 718, 719, 721-724, 726, 737, 773
P. persimilis, 473, 474, 721-724, 726-733
Pichia membranaefaciens, 84
Picnidios, 65, 98, 113, 162
Pieris brassicae, 373, 391
Pieris brassicae GV, 395
Pineus boerneri, 461
Pioluteorina, 99, 970
Piriculariosis, 62, 86, 806, 809
Piriformospora indica, 857, 891, 904
P. indica, 857
Pirrolnitrina, 99, 100, 176, 238, 240
Plagas, control biológico de, 47, 458, 459, 471, 474, 477, 488, 493-495, 680, 718, 720, 734, 737, 933, 943, 1047
Plaguicidas de síntesis química, 203, 436, 493, 494, 694, 695, 706, 710, 840, 1040
Plantas transgénicas, 93, 94, 324, 906, 907, 929, 930
Plásmido, 311, 313, 318, 865, 930, 931, 969
Plasmodiophora brassicae, 610, 612, 648
Plasmopara viticola, 79, 112, 114
P. viticola, 103
Plodia interpunctella, 440, 660
Plodia interpunctella GV, 395
Plutella xylostella, 306, 307, 317, 323, 425-427, 429, 440, 639, 660, 776, 802
P. xylostella, 321, 324
Pochonia chlamydosporia, 189, 768
Podosphaera spp., 112, 114
Podosphaera xanthii, 66, 67, 84, 96
Policétidos sintasas, 173
Polimerasa, 93, 906, 930, 955, 956, 958, 962
Polisacáridos extracelulares, 75, 82, 156
Polistes, 48
Polybia sp., 463, 520
Polydnaviridae, 375, 381, 938
Polyphagotarsonemus latus, 460
Popillia japonica, 302, 306, 307, 314, 928
Porina, 320, 974
Potato leafroll virus, 94
Potato virus X, 93
Potato virus Y, 93
Pouteria caimito, 502, 503
Poxviridae, 375, 381, 938, 964
Praelongorthezia praelonga, 461
P. praelonga, 461
Preformulación, 353, 599, 633, 634, 641, 645, 646
Premnotrypes vorax, 48, 344, 650, 839, 936
P. vorax, 936
Priming, 796-799, 802, 804-806, 992, 993, 998
Proba vittiscutis, 461
Probiótico vegetal, 803
Propágulos, 184, 228, 238, 356, 360, 490, 600, 608, 636, 640, 641, 808, 924, 926, 927, 929
Proprioseiopsis mexicanus, 440
Prorops nasuta, 490, 520, 522, 523
P. nasuta, 521-523, 526, 527, 528
Proteína
Proteína de movimiento, 93, 94
Proteína multifunción HC-Pro, 90
Proteínas alcalinas solubles de cápsulas, 391
GVP, 391
Proteínas G, 172, 173, 418
Proteínas homólogas de avirulencia, 174
Proteínas inactivadoras de ribosomas, 92
Proteínas ligadoras de feromonas, 418
PBP, 418
Proteínas ligadoras de odorantes, 418
OBP, 418
Proteínas quinasas, 173, 174
Proteómica, 72, 872, 952, 954, 957, 959, 962, 963, 965-967, 969, 974-976, 978, 979
Protospora, 304
Prueba de eficacia, 703, 705
Pseudaletia separata, 941
P. separata, 391
Pseudaletia unipuncta, 391, 941
P. unipuncta, 391, 941
Pseudaulacaspis pentagona, 467

Pseudocercospora purpurea, 86

Pseudomonas aeruginosa, 85, 883, 884, 997

P. aeruginosa, 99, 324, 884

Pseudomonas chlororaphis, 101, 179, 182, 279, 971, 994

P. chlororaphis, 280, 320, 321, 971

Pseudomonas fluorescens, 85, 113, 116, 153, 175, 177, 185, 241, 320, 647, 653, 700, 775, 806, 883, 890, 891

P. fluorescens, 99, 175-177, 185, 186, 241, 884, 891, 903

Pseudomonas savastanoi, 69

Pseudomonas spp., 71, 75, 95, 99, 110, 113, 115, 116, 159, 161, 162, 175, 176, 179, 182, 183, 186, 231, 278, 300, 320, 603, 767, 768, 808, 884, 885, 904, 938

Pseudomonas syringae, 69, 85, 117, 230, 234, 243, 805, 891, 1001

P. syringae, 69, 70, 240

Pseudomonas syringae pv. Tomato, 994

Pseudoperonospora cubensis, 70, 71, 79, 105

Pseudozyma aphidis, 82, 96

Pseudozyma flocculosa, 99, 100, 114, 116

P. flocculosa, 82

Pseudozyma rugulosa, 100

P. rugulosa, 82

Pseudozyma sp., 82

Psidium guajava, 436, 502-505

P. guajava, 505

Pterostichus melanarius, 1000

Puccinia graminis, 63, 1039

Puccinia spp., 62, 63, 114, 117

Puccinia striiformis, 82

P. striiformis, 63

Puccinia thlaspeos, 767

P. triticina, 63

Purpureocillium lilacinum, 354-356, 927

Pyricularia oryzae, 62, 71, 81, 86

Pythium afertile, 997

Pythium debaryanum, 149

P. debaryanum, 151

Pythium sp., spp., 97, 150, 151, 180-182, 617, 862, 887

Pythium splendens, 197, 199, 603, 610, 648, 805, 904

P. splendens, 197, 611, 612

Pythium ultimum, 71, 163, 904, 970, 997

P. ultimum, 163

Q

Quararibea cordata, 502

Quick look, 599, 619, 634

Quimotripsina, 317

Quitinasas, 96-98, 101, 104, 162, 163, 173, 174, 232, 240-242, 316, 319, 341, 342, 603, 638, 657, 885, 898, 924, 933, 934, 937, 940, 942, 974, 975

Endoquitinasa, 98, 197, 199, 904, 934

Exoquitinasa, 197, 199, 240

Quorum sensing, 156, 260, 398, 885, 889, 992, 998

R

Ralstonia solanacearum, 276, 277, 280, 281, 640, 806, 894, 898

R. solanacearum, 279

RdRp, 906, 930

Reacción en cadena de la polimerasa, 962

PCR, 200, 273, 311, 865, 962, 979

Receptores de feromonas, 418

PR, 242, 418, 904

Receptores de odorantes, 415

OR, 415, 418

Reclutamiento, feromonas de, 414

Redes neuronales artificiales, 667

Registro

Registro de bioplaguicida, 165, 630, 679, 695-709, 782

Reoviridae, 375, 382, 938

Resiliencia, 264, 824, 835-838, 840, 899, 976, 994

Resistencia

Resistencia genética, 798-801

Resistencia inducida, 96, 102-104, 113, 117, 118, 202, 609, 796, 798, 799, 802, 804-806, 857, 870, 882, 886

Resistencia intrínseca, 801

Resistencia sistémica adquirida, 100, 177, 804, 858, 971

SAR, 100, 177, 804, 805, 858

Resistencia sistémica inducida, 79, 100, 103, 199, 260, 804, 856, 857

ISR, 100, 114, 161, 162, 168, 176, 177, 260, 312, 904

Reynoutria spp., 765

T

Tamarixia radiata, 462, 518-520, 531

T. radiata, 463, 519, 520

Tasa de crecimiento de la plaga, 829

Tecia solanivora, 383, 389, 425, 429, 437, 439, 442, 494, 607, 610, 613, 648, 679, 786, 839, 884

T. solanivora, 383, 384, 437, 438, 613, 614, 615, 616

Técnica

Técnica de reemplazo, 636

Técnica de retiro, 636

Técnica de suplementación, 636

Técnicas de *fingerprinting*, 865

Tecnología Sanger, 957

Telenomus sphingis, 508

Territorialidad, feromonas de, 414

Tetrainoculantes, 884

Tetranychus spp., 441, 473

Tetranychus urticae, 320, 321, 323, 460, 718, 721, 722, 724

T. urticae, 473, 474, 721-732

Thaumetopoea pityocampa, 382

Thysanomyia sp., 508

Thysanoplusia orichalcea, 939

Tobacco mosaic virus, 91

TMV, 88-90, 93, 94

Tobacco rattle virus, 94

TRV, 94

Tobacco ringspot virus, 88, 94

TRSV, 88, 94

Tobamovirus, 94

Tobravirus, 94

Tolypocladium spp., 859

Tomato spotted wilt virus, 87

Tomato yellow leaf curl virus, 93

TYLCV, 93

Torradovirus, 495

Torulopsis sp., 71, 75

Totiviridae, 87

Toxotrypana curvicauda, 490

Toxotrypana, 1002

Trachypogon sp., 1043

Transcriptómica, 276, 872, 952, 954, 955, 957, 959, 962, 963, 964, 969, 970-972, 974, 976, 978, 979

Trialeurodes vaporariorum, 348, 495, 496, 610, 612, 648, 649, 704, 837, 867

T. vaporariorum, 348, 349, 350, 495-499, 610, 612, 613, 616, 838

Trialeurodes variabilis, 495, 496, 498

T. variabilis, 496-499

Tribliographa sp., 501, 503

Tribolium castaneum, 307, 930

T. castaneum, 440

Trichoderma asperellum, 80, 115, 178, 189, 190, 191, 654, 765, 785, 863, 864

T. asperellum, 113, 180, 184, 186, 187, 658, 775

Trichoderma gamsii, 115, 178, 775

T. gamsii, 113, 180, 775

Trichoderma hamatum, 78, 114, 115, 178, 180, 863, 864, 883, 972

T. hamatum, 183, 184, 972

Trichoderma harzianum, 79, 80, 97, 102, 115, 178, 180, 189-191, 232, 234, 637, 638, 647, 653, 668, 700, 775, 811, 863, 864, 883, 898, 927, 928

T. harzianum, 79, 85, 97-105, 179, 183, 775, 811, 863, 883, 898, 904, 927

Trichoderma koningiopsis, 79, 80, 98, 106, 183, 191, 192, 197, 199, 200, 610, 611, 615, 648, 674, 677, 679, 786, 805, 861, 884, 904

T. koningiopsis, 107, 160, 184, 186, 187, 197-199, 610-612, 638, 658

Trichoderma longibrachiatum, 80, 860

T. longibrachiatum, 861

Trichoderma reesei, 79, 170, 668

T. reesei, 100

Trichoderma sp., spp., 48, 78, 79, 81, 86, 96-98, 100, 101, 113, 150, 159, 161, 162, 169, 170, 172-175, 180, 183, 184, 186, 187, 191, 197, 200, 603, 605, 611, 635, 702, 767, 768, 771-773, 804, 863, 864, 884, 885, 896, 903, 904, 977

Trichoderma stromaticum, 189, 863, 864, 869

T. stromaticum, 81, 869

Trichoderma virens, 169, 775, 904

T. virens, 100, 183

Trichoderma viride, 183, 232, 234, 653, 671, 700, 775, 903, 995

T. viride, 82, 100

Trichodex®, 102, 104, 105, 106, 767

Trichogramma atopovirilia, 490, 494
T. atopovinilia, 737
Trichogramma chilonis, 516
Trichogramma evanescens, 491
T. evanescens, 494
Trichogramma exiguum, 490, 508, 514, 515, 737, 773, 1047
T. exiguum, 494, 515, 516, 737
Trichogramma fasciatum, 494
Trichogramma lopezandinensis, 494
T. minutum, 494
T. perkinsi, 494
Trichogramma pretiosum, 490, 515, 737, 1047
T. pretiosum, 493, 494, 516, 737
T. semifumatum, 494
Trichogramma sp., spp., 48, 493-495, 509, 736, 737, 771, 772, 1047
Trichogrammatoidea., 491
Trichoplusia ni, 306, 323, 354, 377, 660, 701, 772, 939, 977
T. ni, 939, 940
Trichopria sp., 501, 503, 505
Trichothecium roseum, 92
Tricoideas, sensilias, 419
Tricotec®, 98, 106-108, 182, 192, 197, 200, 201, 612, 648, 678, 679, 786
Trigonospila sp., 511
Trilla, feromonas de, 414
Tripsina, 317
Trybliographa daci, 505, 506
Tsukamurella paurometabola, 768
Tuta absoluta, 384, 429, 432, 433, 435, 440, 610, 615, 651, 975
T. absoluta, 384, 432, 433, 617
Typhlodromalus aripo, 469
T. aripo, 469, 470
Typhula idahoensis, 82

U

Ueckermannseius tenuiscutus, 470
Umbral de daño económico, 433, 826, 828
Unaspis citri, 462, 468
U. citri, 462
Ustilago maydis, 62
U. maydis, 65
Utetes anastrephae, 500, 503, 506

V

Vegetative insecticidal proteins, 308
VIP, 308
Verticillium albo-atrum, 927
Verticillium lecanii, 71, 343, 345, 346, 652, 653, 668
Verticillium sp., spp., 164, 180, 181, 635, 887
Vigilancia
Vigilancia científica y tecnológica, 632
Vigilancia comercial, 632
Vigilancia competitiva, 633
Vigilancia estratégica, 633
Vigilancia normativa y regulatoria, 632
Vigilancia tecnológica, 599, 619, 630, 632, 633
Virus
Virus africano del mosaico de la yuca, 87
Virus atenuados, 88-91
Virus de la mancha anular de la papaya, 91, 93
PRSV, 93
Virus de la mancha anular del tabaco, 88, 94
TRSV, 88, 94
Virus del bronceado del tomate, 87
Virus del cascabeleo del tabaco, 94
TRV, 94
Virus del mosaico amarillo del calabacín, 90, 92
ZYMV, 90, 94
Virus del mosaico de la alfalfa, 93, 94
AMV, 93, 94
Virus del mosaico de la sandía, 94
WMV, 94
Virus del mosaico del pepino, 87, 90, 91
CMV, 87, 90, 93, 94, 890
Virus del mosaico del tabaco, 88, 89, 91
TMV, 88, 89, 90, 93, 94
Virus del rizado amarillo del tomate, 93
TYLCV, 93
Virus incrustados (*embedded viruses*), 939

Volátiles
Volátiles microbianos, 74, 992, 993, 998-1003, 1005
Volátiles, feromonas, 418, 748
Voltinismo, 1038, 1041

W

Watermelon mosaic virus, 94
WMV, 94
Wolbachiam, 492, 498

X

Xantana, 69
Xanthomonadin, 69
Xanthomonas axonopodis, 69, 117, 894, 998
X. axonopodis, 69, 70
Xanthomonas campestris, 69, 117, 151, 892, 895
X. campestris, 69, 70
Xanthomonas oryzae, 69, 117
X. oryzae, 69
Xanthomonas spp., 75, 115
Xenobióticos, 269, 810, 885
Xestia c-nigrum, 391, 392, 934, 940
X. c-nigrum, 940

Y

Yersinia entomophaga, 298, 299, 300, 317, 319
Y. entomophaga, 319, 320, 321
Yersinia spp., 319, 324

Z

Zagloba beaumonti, 466
Zea mays, 65, 516
Zelus cf. *nugax*, 463, 520
Zero-mode waveguide, 956
Zonosemata electa, 999
Zucchini yellow mosaic virus, 90, 92
ZYMV, 90, 94

Impresión y encuadernación:
Fundación Cultural Javeriana de Artes Gráficas (JAVEGRAF)

Terminó de imprimirse en octubre de 2018,
Bogotá, D.C., Colombia

Alba Marina ha publicado 96 artículos científicos, 22 libros y 22 capítulos de libro. Desde su llegada a la Corporación, gestionó recursos económicos y técnicos que permitieron construir, equipar, formar investigadores y poner en marcha un laboratorio de investigación y desarrollo de bioplaguicidas, una planta piloto para el escalamiento semicomercial de bioplaguicidas y una planta para la producción comercial del bioplaguicida Baculovirus-Corpoica. Ha liderado proyectos que han conducido al desarrollo de varios bioplaguicidas registrados ante el ICA (Baculovirus-Corpoica®, Lecabiol® y Tricotec®), los cuales se han logrado gracias a un equipo multidisciplinario de investigación. Debido a los logros de su grupo de investigación, lideró el proceso que condujo al licenciamiento internacional de dos tecnologías de formulación aplicables a bioplaguicidas. Dichos licenciamientos se han hecho a una empresa alemana y a una brasilera, convirtiéndose uno de ellos en un caso de éxito a nivel mundial. Ha recibido múltiples premios otorgados por las sociedades científicas de Colombia (Asociación Colombiana de Fitopatología, Sociedad Colombiana de Entomología, Sociedad Colombiana de Ciencias del Suelo y Asociación Colombiana de Médicos Veterinarios y Zootecnistas) y otros reconocimientos, tanto a nivel nacional como internacional, dentro de los que se destaca un doctorado honoris causa conferido por la Universidad de Ciencias Agrícolas de Suecia.

AGROSAVIA

Corporación colombiana de investigación agropecuaria

El control biológico implica el uso tanto de bacterias, hongos y virus, como de insectos benéficos para el control de fitopatógenos o de insectos plaga, según el caso. Este sistema de control ofrece un enfoque amigable con el medio ambiente que se puede incluir al manejo integrado, en el cual se incorporan los controles cultural, físico y genético y al uso racional de agroquímicos, entre otros. Esta publicación representa una compilación única de 25 capítulos sobre los agentes de control biológico, productos disponibles, casos de éxito y perspectivas, que han sido escritos por reconocidos expertos en su campo de investigación.

Este libro comprende capítulos específicos sobre los diferentes tipos de agentes de biocontrol utilizados para el control de enfermedades y de insectos plaga mediante el uso de bacterias, hongos y virus benéficos, en estos se revisa la historia del control biológico, se destacan los principales agentes de control utilizados, sus modos de acción, los productos comerciales disponibles, los casos de estudio y las perspectivas de cada tema. También se incluyen capítulos sobre el uso de depredadores y parasitoides, en los que se muestra el contexto histórico, casos de éxito y las perspectivas de su uso. Así mismo, contiene capítulos sobre los aspectos de investigación y desarrollo que conducen a la obtención de agentes de control biológico disponibles para productores agrícolas, profundizando en las etapas de prueba de concepto, desarrollo de productos, escalamiento, registro, comercialización y mercado, además de los aspectos sobre el valor de la tecnología. Igualmente se incluyen varios capítulos sobre las perspectivas y el futuro de los diferentes componentes de control biológico explotados y otros que podrían tener gran potencial hacia el futuro.

ISBN: 978-958-740-255-1
ISBN: 978-958-740-257-5

BAC
BIBLIOTECA AGROPECUARIA DE COLOMBIA

Correo: bac@agrosavia.co
Teléfono: (+57 1) 4227300 Ext. 1257 o 1274
Skype: biblioteca.agropecuaria

DISTRIBUCIÓN GRATUITA
PROHIBIDA SU VENTA

El campo es de todos
Minagricultura