

Capítulo 1

Control biológico de patógenos foliares

Chapter 1

Biological control of foliar pathogens

Alba Marina Cotes,¹ Yimmy Zapata,¹ Camilo Beltrán-Acosta,¹
Sadao Kobayashi,¹ Liz Uribe,¹ Yigal Elad²

¹ Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA)

² Departement of Plant Pathology and Weed Research Sciences, ARO,
The Volcani Center

Contenido

Introducción	61
Principales patógenos foliares	62
Hongos fitopatógenos	62
Bacterias fitopatógenas	69
Contexto histórico del control biológico de patógenos foliares	70
Ecología de la filósfera, caulósfera y antósfera	73
Principales agentes de control biológico de fitopatógenos foliares	78
Hongos en el control biológico de patógenos foliares	78
Bacterias en el control biológico de patógenos foliares	85
Micovirus en el control biológico de patógenos foliares	86
Control biológico de virus de plantas	87
Daños en plantas causados por virus y sus características	87
Métodos de control de los virus de las plantas	88
Modos de acción de los biocontroladores de patógenos foliares	94
Competencia	95
Micoparasitismo y lisis	96
Antibiosis	98
Inducción de resistencia	100
Modo de acción de <i>T. harzianum</i> T39, un caso de estudio	102
Algunas experiencias exitosas en el control de fitopatógenos foliares	104
Trichodex®	104
Tricotec®	106
Fungifree AB®	110
Bioplaguicidas registrados para el control de patógenos foliares. Comunidad Económica Europea y Estados Unidos de América	112
Conclusiones y perspectivas	117
Agradecimientos	118
Referencias	119

Resumen

Los fitopatógenos foliares representan una grave amenaza para la seguridad alimentaria mundial. El control biológico se considera ecológicamente amigable y una alternativa clave en el manejo de las enfermedades producidas por estos. Además, se ha demostrado que varios microorganismos son efectivos en el control de muchas de estas enfermedades. En este capítulo se analizan varios de los más importantes patógenos foliares, así como los microorganismos antagonistas más frecuentemente usados, incluyendo su distribución, ecología, biología y modo de acción. Para ello, se revisan investigaciones realizadas durante las últimas décadas en todo el mundo sobre la evaluación de la eficacia de los agentes de control biológico, con algunas historias de éxito convincentes, así como los factores que fomentan o dificultan su desarrollo.

Palabras clave

Bioplaguicidas, compuestos antivirales, control biológico, fitopatógenos foliares

Abstract

Foliar plant pathogens pose a serious problem for global food security. Biological control is considered ecologically friendly and a key alternative in disease management. Several organisms are known to be antagonistic against foliar pathogens. In this chapter important foliar pathogens and antagonistic microorganisms, their distribution, ecology, biology and their modes of action are described. Many researches carried out worldwide during the last decades on efficacy evaluation of biological control agents with some convincing success stories are extensively reviewed, as well as the factors that encourage or hamper their development.

Keywords

Antiviral compounds, biological control, biopesticides, foliar plant pathogens

Introducción

Los patógenos foliares causan pérdidas económicas y de rendimiento de las principales plantas cultivadas a nivel global (Agrios, 2015); pese a que no hay datos concretos sobre las pérdidas ocasionadas por estos de forma general, se sabe que los hongos son los más limitantes, dentro de los que se destaca *Botrytis cinerea*, agente causal del moho gris, enfermedad a la que se le atribuyen pérdidas anuales por el orden de los us 10 a los us 100 billones (Boddy, 2016). Además, el control de enfermedades ocasionadas por *Botrytis* y otras especies relacionadas, como *Sclerotinia* y *Monilinia*, representa cerca del 8% del mercado global de fungicidas (Phillips & McDougall, 2012), lo que da cuenta de su importancia, aunque para varios de estos, y particularmente para botryocidas, se han detectado casos de resistencia en muchos países y cultivos (Hahn, 2014; Leroux, 2004; Walker et al., 2013).

En el caso de los patógenos bacterianos y virales, son escasos o inefectivos los plaguicidas disponibles. Los antibióticos que se utilizan para controlar las bacterias fitopatógenas tienen efectos colaterales adversos, como la resistencia a los antibióticos y la diseminación de cepas resistentes a animales y a humanos (McManus, Stockwell, Sundin, & Jones, 2002). Por otra parte, las enfermedades virales se están convirtiendo en un tema crítico para los agricultores (Scholthof et al., 2011) y actualmente no existen métodos de control efectivos, excepto la ingeniería genética o el mejoramiento genético convencional (Kupferschmidt, 2013; Murphy, 2006).

Durante las últimas décadas, la restricción en la aplicación de fungicidas y de bactericidas se plantea como una necesidad para reducir el impacto sobre el medio ambiente (Fenner, Canonica, Wackett, & Elsner, 2013) y limitar los residuos en los productos cosechados (Verger & Boobis, 2013). Al mismo tiempo, la resistencia a muchos plaguicidas impide un control efectivo en campo y lleva a su sobreutilización (Brent & Hollomon, 2007), lo que estimula la búsqueda e implementación de alternativas de control, amigables con la salud humana y con el medioambiente, tales como el control biológico.

No obstante, para lograr un control efectivo es necesario conocer la biología del patógeno, la epidemiología de la enfermedad, la ecología de los agentes biocontroladores y las diversas interacciones que estos microorganismos tienen entre sí, con las plantas hospederas, con las arvenses, con el microbioma de la filósfera y con todos los factores ambientales que los rodean, para así optimizar su aplicación y generar sistemas adaptados de producción masiva y de formulación del agente de control biológico.

El control biológico de fitopatógenos foliares en varios casos ha presentado resultados inconsistentes, debido en gran medida a la naturaleza compleja de la ecología de las filósfera, que es un medio frecuentemente inhóspito para el desarrollo y actividad de los microorganismos biocontroladores que se aplican (Andrews & Harris, 2000). Sin embargo, hay varios casos de éxito, principalmente en cultivos bajo invernadero (Cotes, Moreno, Molano, Villamizar, & Piedrahita, 2007; Elad, 1994; Elad & Freeman, 2002; Elad & Shtienberg, 1995; Elad & Stewart, 2004; Elad, Zimand, Zaqs, Zuriel, & Chet, 1993b; Freeman et al., 2004; Guetsky, Shtienberg, Elad, & Dinoor, 2001; Lee, Lee, Kim, & Ryu, 2017; Marchand & McNeil, 2000; Moreno & Cotes, 2006; Moreno, Ramírez, Zapata, Díaz, & Cotes, 2012; Moreno, Cotes, & Vergara, 2007; O'Neill, Elad, Shtienberg, & Cohen, 1996; Paulitz & Bélanger, 2001; Perazzolli, Dagostin, Ferrari, Elad, & Pertot, 2008; Shafir, Dag, Bilu, Abu-Toamy, & Elad, 2006; Zapata et al., 2013b; Zapata & Cotes, 2013; Zapata et al., 2016) y hay optimismo con respecto a las perspectivas futuras de este método de control (Fravel, 2005; Guetsky, Shtienberg, Dinoor, & Elad, 2002).

En el presente capítulo se describirán las enfermedades más limitantes, se analizará la filósfera y sus características, el contexto histórico del control biológico de los patógenos foliares, así como los principales agentes biocontroladores investigados y desarrollados como bioplaguicidas.

Principales patógenos foliares

La filósfera es una comunidad microbiana rica y variada con diversos grupos funcionales. Su composición está fuertemente influenciada por factores genotípicos y ambientales, muchos de los cuales pueden ser manipulados mediante estrategias de producción, prácticas culturales y uso de productos para fitoprotección, además de los factores medioambientales como humedad, radiación solar, viento y entomofauna, entre otros (Andrews, 1992). Todos estos factores también afectan las interacciones complejas entre los microorganismos, y estos a su vez afectan su interacción con la planta huésped. Comprender la dinámica de la población y el equilibrio entre los organismos de la filósfera (patógenos y benéficos) como un sistema ecológico podría conducir a nuevos enfoques para mejorar la sostenibilidad.

Dentro de los diez principales hongos y diez bacterias fitopatógenos considerados de mayor importancia a nivel mundial por la revista *Molecular Plant Pathology*, dado el impacto que ocasionan, se encuentran como el grupo más representativo los patógenos foliares o aquellos que, además de afectar el follaje, afectan otros órganos de la planta. Sin embargo, debe considerarse que su importancia y prioridad puede estar influenciada por su relevancia a nivel local en los diferentes continentes (Dean et al., 2012; Mansfield et al., 2012). A continuación, se describen las enfermedades causadas por estos patógenos.

Hongos fitopatógenos

Nueve de los diez hongos priorizados a nivel mundial, son patógenos foliares, los cuales fueron clasificados en las siguientes posiciones: 1) *Magnaporthe oryzae*, 2) *Botrytis cinerea*, 3) *Puccinia* spp., 4) *Fusarium graminearum*, 5) *Blumeria graminis*, 6) *Mycosphaerella graminicola*, 7) *Colletotrichum* spp., 8) *Ustilago maydis* y 9) *Melampsora lini*. Dentro de ellos se encuentran patógenos biótrofos, hemibiótrofos y necrótrofos. Además de dichas especies, se hizo mención especial a *Phakopsora pachyrhizi* agente causal de la roya asiática de la soya (Dean et al., 2012); a continuación, se expondrán en detalle:

- *M. oryzae* (anamorfo *Pyricularia oryzae*) causa la piriculariosis, que es la enfermedad más importante del arroz desde el punto de vista económico. Las fases críticas para la enfermedad se observan entre 25 y 35 días después de la siembra y durante las etapas de llenado de grano. Los daños en las hojas y en la panícula provocan pérdidas tanto directas como indirectas en el rendimiento del grano (Teng, 1994). Aunque *M. oryzae* tiene una amplia variedad de huéspedes monocotiledóneos, no se ha reportado que infecte plantas dicotiledóneas. Este hongo actúa como un hemibiótrofo, ya que prolifera inicialmente dentro de las células vivas del huésped, antes de cambiar a un modo necrotrófico destructivo. La infección en el sistema foliar del arroz inicia con un tubo germinal producido a partir del conidio, que se diferencia como un apresorio, adhiriéndose firmemente a la superficie de la planta mediante un mucílago (Howard, Ferrari, Roach, & Money, 1991). La presión ejercida por el apresorio melanizado permite la penetración (De Jong, McCormack, Smirnoff, & Talbot, 1997; Howard et al., 1991). Después de la penetración, este se diferencia en una hifa infecciosa que crece intra e intercelularmente (Heath, Howard, Valent, & Chumley, 1992), dando como resultado las lesiones típicas de la enfermedad (Tucker & Talbot, 2001).
- *B. cinerea* (en su forma anamórfica) o *Botryotinia fuckeliana* (en su forma teleomórfica) causa la enfermedad conocida como el moho gris (figura 1.1). Este hongo se considera como un necrótrofo típico, que coopta vías de muerte celular programada en el huésped (Van Baarlen, Woltering, Staats, & Van Kan, 2007). *B. cinerea* es destructivo en tejidos maduros o senescentes de dicotiledóneas y puede permanecer quiescente durante un tiempo considerable, antes de causar pudrición en los tejidos, lo que ocurre cuando cambia la fisiología del huésped (Williamson, Tudzynski, Tudzynski, & Van Kan, 2007). Se ha encontrado que numerosas dicotiledóneas albergan infección endofítica de *B. cinerea* antes de pasar a la fase necrótrofa, lo que hace que el ciclo de infección sea

muy complejo y, a su vez, de difícil manejo (Dewey & Grant-Downton, 2016; Van Kan, Shaw, & Grant-Downton, 2014). Según Jarvis (1977), *B. cinerea* tenía más de 200 huéspedes; sin embargo, recientemente se ha reportado que este número supera los 1.400 huéspedes, pertenecientes a 586 géneros (Elad, Pertot, Cotes-Prado, & Stewart, 2016) y que este patógeno puede infectar material de siembra, plántulas, tallos, hojas, flores y frutos en las etapas de pre y poscosecha. *Botrytis cinerea* puede hibernar mediante esclerocios melanizados (~ 4 mm), resistentes a condiciones ambientales adversas (Holtz, Coertze, & Williamson, 2007). En condiciones favorables, como temporadas húmedas interrumpidas en primavera, los esclerocios germinan para producir micelio y conidios. *B. cinerea* también puede producir clamidosporas hialinas de paredes gruesas. Estas varían de tamaño y forma, pueden sobrevivir períodos de sequía de hasta tres meses y, a menudo, se encuentran en cultivos viejos, de forma intercalada o en los

extremos de las hifas; en condiciones favorables, estas clamidosporas germinan para producir hifas o microconidios (figura 1.2) (Urbasch, 1983).

- *Puccinia* spp. son hongos basidiomicetes biótrofos, con ciclos de vida heterocíclicos y heterocigotos, causantes de royas (Jin, Szabo, & Carson, 2010). A través de haustorios, los hongos toman los nutrientes que se encuentran dentro de las células vegetales. En el trigo producen la roya del tallo negro (causada por *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*), la roya amarilla (*P. striiformis* f. sp. *tritici*) y la roya parda de la hoja (*P. triticina*). Debido a su alta esporulación, diseminación eficiente, variabilidad patogénica y por el cultivo generalizado de trigo en ambientes propicios, estas royas se encuentran ampliamente diseminadas (Voegelé & Mendgen, 2011).
- *F. graminearum* (Teleomorfo *Gibberella zeae*) es un ascomiceto, altamente destructivo de todos los cereales (Dean et al., 2012), que puede coexistir



Foto: Yigal Elad

Figura 1.1. Moho gris producido por *B. cinerea* en uvas.

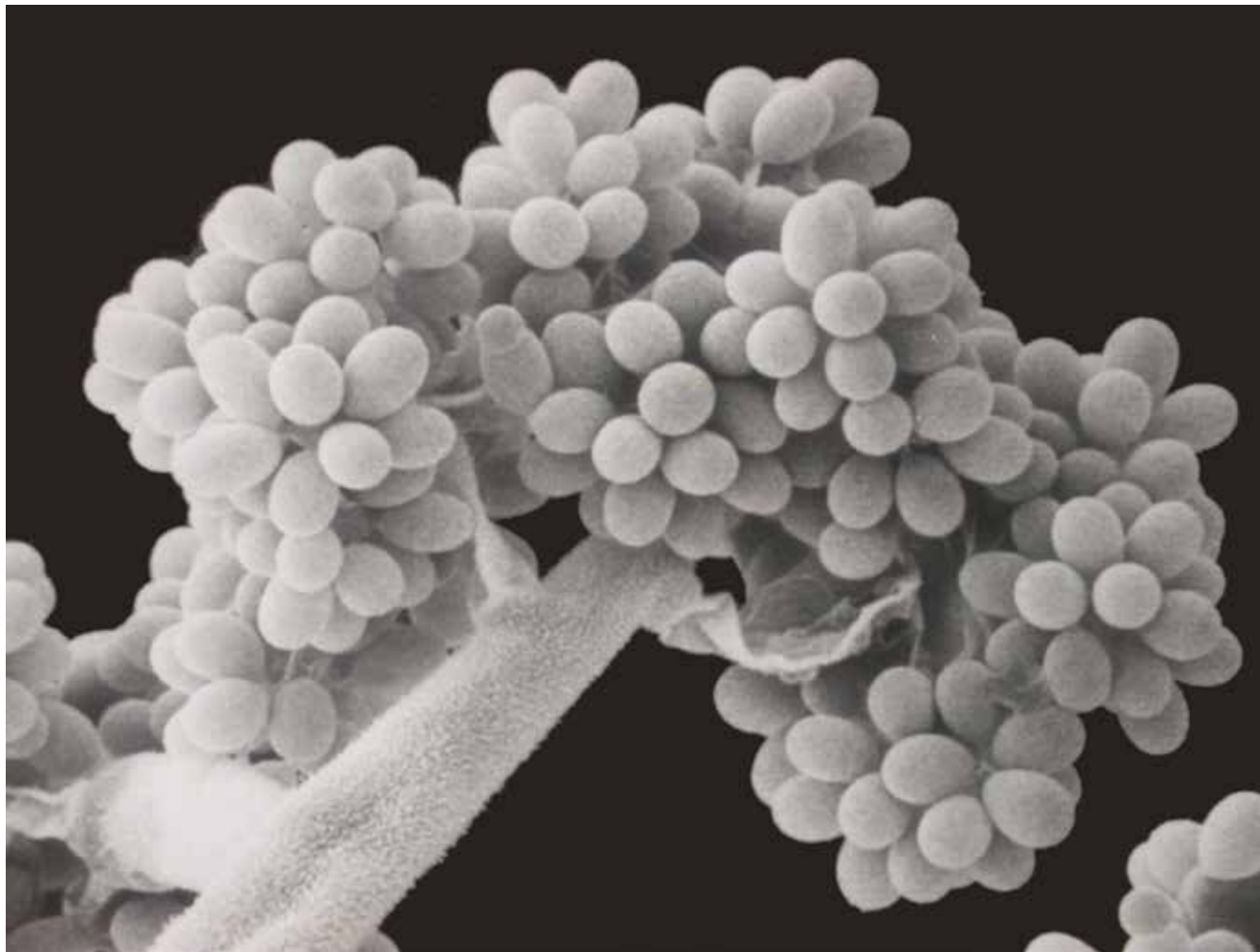


Foto: Yigal Elad

Figura 1.2. Conidióforo de *B. cinerea*. Imagen al microscopio electrónico de barrido.

y coinfectar con otras especies de *Fusarium*. Las mayores pérdidas económicas ocurren cuando *F. graminearum* infecta los tejidos florales, lo que afecta la calidad cosmética del grano, además de acumular micotoxinas en estos (Leonard & Bushnell, 2003).

- *B. graminis* es un ascomiceto perteneciente a los Erysiphales (Takamatsu, 2004); es un patógeno biótrofo que causa el oídio o mildew polvoso de los cereales, particularmente en trigo y cebada. El hongo persiste durante el invierno como micelio en el rastrojo del trigo y en gramíneas silvestres. Durante la primavera, las ascosporas son producidas y esparcidas por el viento; primero ataca las hojas más bajas, para después ascender hasta alcanzar la espiga, lo que reduce el rendimiento de grano. *B. graminis* tiene un estrecho rango de huéspedes, en los que las 'formae speciales' *tritici* y *hordei* infectan trigo y cebada, respectivamente (Wyand & Brown, 2003).
- *M. graminicola* (*Septoria tritici* anamorfo) es un ascomiceto que causa la septoriosis del trigo; la infección empieza por las hifas que crecen en la superficie de las hojas y penetran a través de las estomas mediante un apresorio, produciendo colonización intercelular asintomática (> 7 días), antes de producir lesiones necróticas en las hojas, dentro de las cuales el hongo esporula asexualmente; en esta última fase, se convierte en necrótrofo (Kema, Annone, Sayoud, & Van Silfhout, 1996; Kema, Sayoud, Annone, & Van Silfhout, 1996). Esta enfermedad causa pérdidas económicas de consideración en el trigo, particularmente en regiones templadas (Orton, Deller, & Brown, 2011).
- *Colletotrichum* spp., en su forma asexual, se incluyó en la división Ascomycota, como su género sexual *Glomerella*. Este es un hemibiótrofo que tiene gran facilidad para cultivarse *in vitro*; además, es uno

de los géneros más comunes e importantes, ya que la mayoría de los cultivos son susceptibles a una o más especies de este patógeno. Estos hongos causan la antracnosis, cuyos síntomas incluyen lesiones necróticas hundidas en hojas, tallos, flores y frutos (Agrios, 2015); frecuentemente, expresan síntomas en campo (figuras 1.3 y 1.4), aunque en algunos casos permanecen quiescentes y se expresan en la poscosecha. El género *Colletotrichum* incluye una serie de fitopatógenos de gran importancia, que causa enfermedades en plantas leñosas y herbáceas. Su distribución es principalmente tropical y subtropical, aunque hay algunas especies en zonas templadas. La producción de frutas se ve particularmente afectada, tanto cultivos de alto valor como la fresa, el mango, cítricos y el aguacate, como en cultivos básicos como el banano (Cannon, Damm, Johnston, & Weir, 2012). No obstante, también puede afectar cultivos de subsistencia, tales como el plátano y la yuca (Prusky, 1996), el café y cereales como el maíz, la caña de azúcar y el sorgo (Cannon et al., 2012).

- *U. maydis* es un basidiomycete biótrofo que causa el carbón común del maíz; este produce agallas tumorales formadas en el tejido del huésped en crecimiento activo, que contienen masas de teliosporas oscuras y hollín. El hongo tiene un ciclo de vida dimórfico, con una fase saprófita tipo levadura, que cambia a crecimiento filamentoso y patogénico tras la fusión de hifas. Infecta dos huéspedes: maíz (*Zea mays*) y teosinte (*Zea mexicana*). Además de la importancia de la enfermedad, *U. maydis* se ha utilizado como un organismo modelo para estudiar una variedad de fenómenos biológicos (Matei & Doehlemann, 2016).
- *M. lini* pertenece a la familia Melampsoraceae (Basidiomycetes, orden Uredinales). Es un parásito obligado que causa la roya del lino en donde desarrolla su ciclo completo en cinco etapas. Esta enfermedad reduce el rendimiento y la calidad de la fibra y de la semilla. El patógeno pasa el invierno en estado telial y germina en primavera, etapa en la que las teliosporas producen basidios con basidiosporas haploides. Las basidiosporas infectan las hojas y los tallos del lino y forman espermogonios (picnidios), en los que los espermacios se desarrollan. Estos últimos se unen



Figura 1.3. Mangos afectados en campo por *Colletotrichum gloeosporioides*. a. Frutos con síntomas visibles de antracnosis; b. Frutos recién cosechados y severamente afectados por la enfermedad; c. Desarrollo de acérvulos del patógeno en fruto incubado en laboratorio.



Foto: Jimmy Zapata

Figura 1.4. Antracnosis del tomate de árbol (*Solanum betaceum*) producido por *C. gloeosporioides*.

a otros de sexo opuesto (estado sexual) y dan lugar a aecidios que forman pústulas anaranjadas con aecidiosporas unicelulares dicarióticas. La infección de plantas con aecidiosporas resulta en la formación del uredo-micelio y el desarrollo de urediniopústulas con urediniosporas (la etapa repetitiva del hongo). Bajo condiciones climáticas favorables (18-22 °C y humedad disponible para la germinación), las urediniosporas producen nuevas generaciones cada 8 a 10 días, infectando así la totalidad del cultivo. En caso de condiciones desfavorables (clima seco y caliente, o enfriamiento otoñal), el hongo entra en reposo (etapa telial) (Kutuzova, Porokhvinova, & Brutch, 2017).

En este listado no se mencionan varias enfermedades que revisten particular importancia; por ejemplo, solo se cita un caso de mildew polvoso del trigo, pero esta enfermedad es extremadamente común y generalizada, y es económicamente uno de los grupos de enfermedades más importantes que infectan muchos taxones de plantas (excepto gimnospermas), siendo los cultivos más gravemente infectados los cereales, las hortalizas y las frutas (Boddy, 2016).

Existen muchos géneros y especies diferentes de hongos que producen el mildew polvoso (por ejemplo, *Erysiphe* spp., *Sphaerotheca* spp.) y cada especie afecta plantas específicas. Los mildew polvosos generalmente no requieren de condiciones húmedas para establecerse y desarrollarse. Una gran variedad de cultivos de hortalizas se ve afectados por mildew, incluyendo alcachofa, frijoles, remolacha, zanahoria, pepino, berenjena, lechuga, melones, chirivías, guisantes, pimientos, calabazas, radicchio, rábanos, calabaza, tomatillo, tomates, nabos, manzana, fresa, frambuesa, cereza, vides, nectarines, melocotón y ciruela, entre otros. Ejemplos de estos son *Podosphaera xanthii* (anteriormente conocido como *Sphaerotheca fuliginea* y *Sphaerotheca fusca*) y *Erysiphe cichoracearum*, los dos hongos más comúnmente registrados en cucurbitáceas (figuras 1.5 y 1.6).

Varios hongos de mildew polvoso causan enfermedades similares en diferentes plantas, tales como especies de *Podosphaera* en frutas de manzana, especies de *Sphaerotheca* en frutos de hueso, *Erysiphe necator* en vid (Flint, 1998; McCain, 1994) y *Sphaerotheca macularis* en mora (figura 1.7) (Horst, 2013).



Foto: Yigal Elad

Figura 1.5. Mildeo polvoso del pepino producido por *Podosphaera xanthii*.

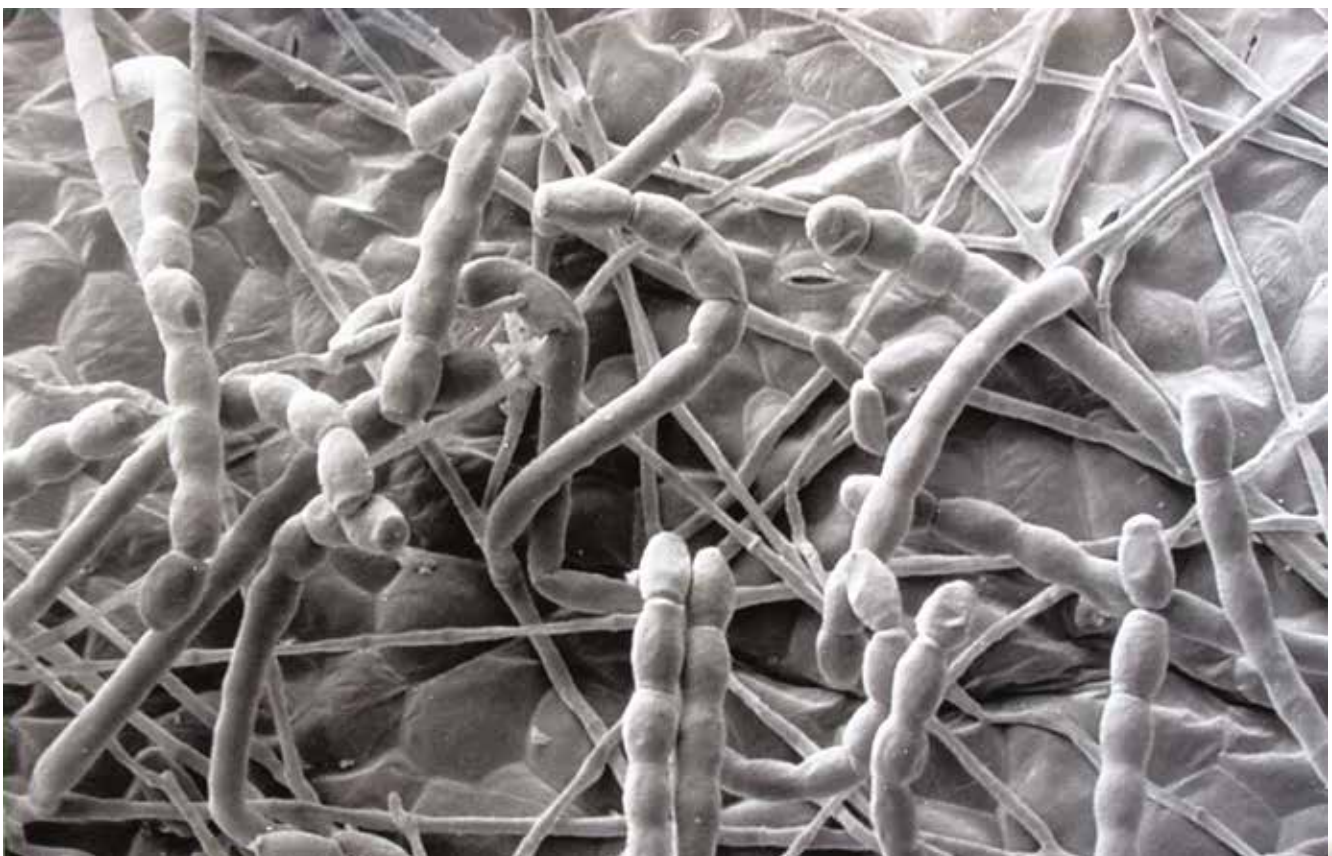
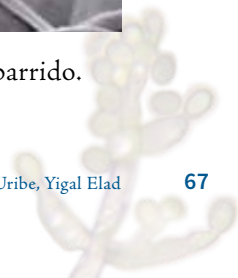


Foto: Yigal Elad

Figura 1.6. Aspecto microscópico del Mildeo polvoso del pepino. Imagen al microscopio electrónico de barrido.



Esta publicación tampoco hace mención al tizón de la papa, causante de hambrunas en Europa (Goodwin, Cohen, & Fry, 1994), la sigatoka negra del banano y plátano (Cuéllar-Quintero, Álvarez-Cabrera, & Castaño-Zapata, 2011) y la roya del café (McCook, 2006), todos ellos problemas muy limitantes en la producción de los cultivos afectados en América Latina. La gota o tizón tardío causada por *Phytophthora infestans* se presenta principalmente en las regiones húmedas de las zonas templadas y tropicales, incluida Colombia. Esta es la enfermedad más limitante de la papa, aunque también afecta al tomate y a otras solanáceas (Goodwin et al., 1994;

Garry et al., 2005). La sigatoka negra, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* (anamorfo *Paracercospora fijiensis*), es la enfermedad foliar que representa la principal limitante en la producción de musáceas (plátano y banano) a nivel mundial (Cuellar-Quintero et al., 2011). La roya del café, causada por *Hemileia vastatrix*, ha producido epidemias de gran magnitud que han afectado varios países, incluidos Colombia, algunos de América Central, México, Perú y Ecuador, lo que ha llevado al abandono del cultivo en muchas regiones, cambiando el paisaje socioeconómico e histórico de estas (Avelino et al., 2015).



Fotos: Jimmy Zapata

Figura 1.7. Mildew polvoso de la mora, expresado como encrespamiento de hojas y desarrollo del patógeno en el envés, producido por *Sphaerotheca macularis*.

Bacterias fitopatógenas

Las bacterias fitopatógenas foliares también ocupan un lugar predominante entre las diez consideradas de la mayor importancia, ya que cinco de ellas son patógenos foliares propiamente dichos, y otras aunque no estén estrictamente en este grupo, pueden afectar el follaje. En esta lista se incluyen, en orden de rango: 1) *Pseudomonas syringae*, 4) *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, 5) *Xanthomonas campestris*, 6) *Xanthomonas axonopodis* y 7) *Erwinia amylovora*, de acuerdo con la numeración propuesta por Mansfield et al. (2012). Además, a pesar de no estar en el grupo de las 10 bacterias más importantes, se mencionan *Clavibacter michiganensis* (*michiganensis* y *sepedonicus*) (Eichenlaub & Gartemann, 2011), *Pseudomonas savastanoi* (Rodríguez-Palenzuela et al., 2010) y *Candidatus Liberibacter* (pv. *asiaticus*) (Duan, Wang, & Guo, 2012; Mansfield et al., 2012). A continuación, se expondrán con mayor detalle:

- *P. syringae* es una bacteria gram-negativa que pertenece a la subclase γ de la Proteobacteria; es aerobia estricta, con forma bacilar y flagelos polares (Doudoroff & Palleroni, 1974), aunque es considerada como epífita (Hirano & Upper, 2000); además, es un microorganismo complejo que combina la capacidad de causar enfermedad en las plantas, con la persistencia como saprófito en asociación con material vegetal muerto, pudiendo vivir en agua dulce y en hábitats alpinos (Morris, Monteil, & Berge, 2013). Además, esta bacteria es responsable de daño por heladas en plantas, ya que puede hacer que el agua se congele a temperaturas tan bajas como $-1,8$ °C, aunque hay variantes que causan nucleación de hielo a temperaturas más bajas (debajo de -8 °C). Este fenómeno se debe a diferentes proteínas monoméricas que se ensamblan para convertir agua en hielo, haciendo que a mayor grado de agregación sea más eficiente el núcleo de hielo (Lee, Warren, & Gusta, 1995; Vali, 1995). El epíteto patovar se usa para distinguir entre las habilidades patogénicas de *P. syringae* (Young et al., 1991). Esta bacteria ha evolucionado para interactuar con una amplia gama de plantas en la mayoría de las regiones del mundo; sin embargo, dentro de la especie existe una gran especialización con respecto a cepas específicas. La especialización adicional está mediada por mecanismos de interacción específicos con una sola planta, como lo demuestra el hecho de que causan diferentes enfermedades en el mismo huésped. Por ejemplo, se han descrito más de 80 especies de plantas huéspedes de cepas de *P. syringae* pv. *syringae* (Bradbury, 1986).
- *X. oryzae* es una bacteria gram-negativa en forma de bastón, que produce un pigmento amarillo soluble, llamado “xanthomonadin” y un polisacárido extracelular (EPS) que la protege de la desecación, así como atenúa el efecto del viento y de la lluvia (Swings et al., 1990). Esta bacteria produce el tizón bacteriano de la hoja del arroz y de otras plantas herbáceas, en regiones tropicales y templadas, y ha sido frecuente en Australia, África, América Latina, el Caribe y los Estados Unidos (Mew, Alvarez, Leach, & Swings, 1993). Las pérdidas en rendimientos pueden estar entre el 10 y el 50%. Se disemina por irrigación, por salpicaduras de lluvia que rebotan del rastrojo que queda de cosechas anteriores, siendo esta la fuente más importante de inóculo primario (Mizukami & Wakimoto, 1969; Murty & Devadath, 1984). *X. oryzae* infecta las hojas de arroz a través de los hidátodos foliares. Los síntomas consisten en estrías de aspecto húmedo y color amarillento en los márgenes de las hojas, que al coalescer toman aspecto de quemado y se observan en la parte superior de las hojas bordes ondulados (Niño-Liu, Ronald, & Bogdanove, 2006).
- *X. campestris* es un bacilo gram-negativo, cuyos patovares causan enfermedades de importancia económica en todo el mundo. Entre los más notables se encuentran *X. campestris* pv. *campestris*, agente causal de la podredumbre negra de crucíferas que afecta a todas las *Brassica* cultivadas; *X. campestris* pv. *vesicatoria*, reclasificado como *X. euvesicatoria*, agente causal de la mancha bacteriana de la pimienta y del tomate, y *X. campestris* pv. *malvacearum* (actual *X. axonopodis* pv. *malvacearum*), que causa la mancha angular de la hoja de algodón. Las enfermedades causadas por estas bacterias son particularmente severas en regiones cálidas y húmedas, aunque la pudrición negra también es económicamente importante en regiones templadas, por ejemplo, en el Reino Unido. Esta bacteria también es importante como productora del exopolisacárido xantana, que se utiliza como aditivo de alimentos, en la industria farmacéutica y en la de perforación de pozos

petroleros (Mansfield et al., 2012). *X. campestris* puede diseminarse por semillas, las condiciones húmedas son propicias para la supervivencia epifítica de la bacteria y para su propagación secundaria entre las plantas (Carisse, Willman-Desbiens, Toussaint, & Otis, 1998).

- *X. axonopodis* tiene muchos patovares que causan enfermedades económicamente importantes en diferentes plantas hospederas de importancia agronómica (Young, Park, Shearman, & Fargier, 2008). En la yuca, que es el alimento básico de casi 600 millones de personas en las regiones tropicales del mundo, *X. axonopodis* pv. *manihotis* es el agente causal del tizón bacteriano común, principal enfermedad endémica en áreas subtropicales y tropicales. Esta es una enfermedad foliar y vascular que produce pérdidas entre el 12 y el 100 %, ya

que afecta el rendimiento del cultivo y el material de siembra (Verdier, Restrepo, Mosquera, Jorge, & López, 2004). En los últimos años, en África y Asia se ha presentado una resurgencia significativa de esta enfermedad (Mansfield et al., 2012).

- *E. amylovora* es una bacteria bacilar, gram-negativa, móvil, con flagelos peritricos (Lelliott & Dickey, 1984), que causa la enfermedad conocida como “fuego bacteriano”, que afecta una variedad de plantas de la familia Rosaceae, dentro de las que se destacan manzanos, membrillos, nísperos, perales y otras plantas ornamentales y silvestres (Agris, 2015). La enfermedad se desarrolla esporádicamente, pero, ocasionalmente, es altamente destructiva, especialmente en árboles frutales jóvenes que mueren debido a infecciones que rodean el tronco o los portainjertos (Mansfield et al., 2012).

Contexto histórico del control biológico de patógenos foliares

La microbiología es considerada como una de las ciencias jóvenes del mundo, cuyos registros datan desde mediados de 1800, cuando Pasteur describió y dio a conocer por primera vez el rol de los microorganismos en la naturaleza y su importancia en el bienestar de hombre, y hasta la fecha que los científicos han aislado un sinnúmero de microorganismos de diversos ecosistemas, entre ellos diferentes tipos de suelo, agua, animales y plantas de diferentes especies (Dickinson & Preece, 1977; Jones, 1993; Lemanceau et al., 2017), lo que ha permitido su constante estudio y aprovechamiento.

Entre todos los microorganismos existentes, los que habitan las plantas pueden colonizar tres compartimientos principales, que corresponden a la filósfera (parte aérea), la rizosfera (zona de influencia del sistema radicular) y la endósfera (sistema de transporte interno). La filósfera, que por sí sola incluye hojas, flores y frutos, alberga un número significativo de diferentes poblaciones microbianas. Esta abundancia y diversidad es promovida por la liberación de compuestos orgánicos vegetales y la presencia de nichos favorables para su colonización y desarrollo (Bier, 1964, citado por Dickinson & Preece, 1977). Dicha diversidad de

microorganismos filósfericos conforma una vasta red de poblaciones que interactúan y viven en un estado de equilibrio dinámico, que a su vez es reflejo de los cambios en su entorno (Dickinson & Preece, 1977; Leveau, 2007).

Dentro de las poblaciones filósfericas, autores como Kerling (1958) y Hislop y Cox (1969) han reportado que el mayor número de microorganismos corresponde a bacterias no filamentosas, seguido por levaduras, luego mohos y, en menor proporción, por bacterias filamentosas (actinomicetos). Todos los microorganismos filósfericos cumplen un papel ya sea como benéficos o como patógenos (Dickinson & Preece, 1977). Dentro de los patógenos se han reportado *Mycosphaerella* spp. (Landry et al., 2017), *B. cinerea* (Dean et al., 2012; Elad, 2000a), *Erysiphe cichoracearum* (Gao et al., 2016), *Pseudoperonospora cubensis*, *Sphaerotheca fusca* (Elad, 2000a), *Alternaria* sp. (Fulcher, Cummings, & Bergstrom, 2017), *Corynespora cassiicola* (Louws, Rivard, & Kubota, 2010), *Colletotrichum camelliae*, *Curvularia eragrostidis*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Pestalotiopsis theae* (Saha, Kumar, Ghosh, Kumari, & Saha, 2012) y *P. syringae* pv. *syringae* (Meyer & Leveau, 2012), entre otros, que

son los responsables de desarrollar enfermedades como royas, manchas, oidios y mildes en cultivos de alto impacto económico a nivel mundial.

Además de los reportes de diferentes patógenos foliares, también se ha descrito un número significativo de microorganismos foliares benéficos, que en contraste contribuyen a proveer un equilibrio en ese ambiente, ya que funcionan como una barrera de defensa inicial y contrarrestan la colonización de los diferentes fitopatógenos. Dentro de este grupo se destacan principalmente bacterias de los géneros *Bacillus* spp., *Pantoea* sp. y *Pseudomonas* spp., así como hongos como *Stephanoascus flocculosus*, *Ampelomyces quisqualis*, *Penicillium* sp., *Verticillium lecanii* y *Gliocladium* sp., y levaduras como *Aureobasidium* sp., *Sporobolomyces* sp., *Cryptococcus* sp., *Torulopsis* sp., *Rhodotorula* spp. y *Candida* spp. (Montesinos & Bonaterra, 2009; Ruberson, 1999).

La capacidad antagónica de algunos géneros microbianos radica principalmente en la producción de moléculas tóxicas, la competencia por nutrientes y espacio, y la alteración de la fisiología de la planta hospedera en beneficio de su población, lo que permite mantener el equilibrio poblacional. Esto ha sido reportado desde mediados de la década 1950 por autores como Wood y Tveit (1955), Darpoux (1960), Last y Deighton (1965), Leben (1965), Sinha (1965), Sharma y Mukerji (1973) y Baker y Cook (1974) (todos citados por Dickinson & Preece, 1977). Dichos reportes, junto con publicaciones más recientes, son basados en resultados obtenidos a partir de ensayos realizados bajo condiciones controladas *in vitro* e *in vivo* (Dickinson & Preece, 1977). Esos estudios demuestran que la aspersión sobre la superficie de las plantas de diferentes aislamientos, solos, en mezcla o en formulaciones, reduce exitosamente la incidencia y la severidad de enfermedades causadas por patógenos como *Gremmeniella abietina* (Knudsen & Hudler, 1987), *Cercospora arachidicola* (Kokalis-Burelle, Backman, Rodríguez-Kábana, & Ploper, 1992), *Pythium ultimum* (Whipps, McQuilken, & Budge, 1993), *Rhizoctonia solani* (Rabindran & Vidhyasekaran, 1996), *Pyricularia oryzae* (Vidhyasekaran et al., 1997), *Botrytis fabae* (Jackson, Walters, & Marshall, 1997), *Botrytis cinerea*, *Pseudoperonospora cubensis*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sphaerotheca fusca* (syn. *S. fuliginea*), entre otros (Elad, 2000a).

El entendimiento de la capacidad antagónica de algunos microorganismos y la necesidad de desarrollar una “estrategia de manejo integrado de cultivos” hicieron evidente y estimularon el desarrollo de alternativas de control biológico de patógenos foliares a partir de la década de 1970, cuando se encontraba en pleno auge el uso de plaguicidas químicos tipo fungicidas e insecticidas (Dickinson & Preece, 1977). Debido al aumento de la susceptibilidad de las plantas frente a los patógenos y al efecto negativo de la aplicación de los agroquímicos al medio ambiente, varios trabajos como los de Baker y Cook (1974, citado por Dickinson & Preece, 1977), Baker (1987) y Cook (1988) cuestionaron el impacto del control químico a nivel foliar y, a su vez, hicieron nuevas consideraciones sobre el control biológico como una herramienta útil y ecológica, que incluida dentro de programas de manejo pudieran funcionar para el control de enfermedades.

A partir de esta premisa, los desarrollos de estrategias de manejo integrado de cultivos se enfocaron, desde sus inicios, en controlar los diferentes patógenos foliares y, al mismo tiempo, disminuir el uso de fungicidas químicos (Dickinson & Preece, 1977; Heydari & Pessarakli, 2010). La filósfera como patosistema fue destacada y sirvió como modelo para probar los conceptos y teorías ecológicas de un manejo integrado, efectivo y sostenible por la enorme heterogeneidad, debido a los diferentes factores bióticos y abióticos que allí se encuentran. Dentro de estos factores adversos característicos de la filósfera, se pueden mencionar las constantes fluctuaciones de temperatura, la escasez de nutrientes, los altos flujos de radiación, la humedad, los gases atmosféricos, la contaminación acuosa y la poca disponibilidad de agua (Elad, 1990; Kinkel, 1997; Whipps, Hand, Pink, & Bending, 2008).

Los primeros reportes de agentes biocontroladores foliares se realizaron hacia finales del siglo xx; sin embargo, para la década de los noventa, el progreso en el control biológico de patógenos foliares había sido lento. Para esta época el uso de microorganismos antagonistas tenía poca aplicabilidad y los desarrollos de productos que pudieron emplearse sobre el follaje de las plantas eran escasos. Esto hizo escasa la información disponible comparada con la reportada para el control de patógenos del suelo (Elad, 1990).

La limitada información con respecto a las investigaciones realizadas en el control biológico foliar se

atribuyó en parte a la inconsistencia de los resultados de eficacia, probablemente porque los antagonistas no eran favorecidos por las diferentes condiciones ambientales adversas, que dificultan la introducción, colonización y proliferación de los posibles agentes biocontroladores (Andrews & Harris, 2000; Elad, 1990; Jones, 1993).

Simultáneamente, para esa época se presentó un incremento en el número de casos en que los fungicidas dejaron de ser efectivos para en el control de enfermedades, debido al rápido desarrollo de resistencia de algunos patógenos frente a moléculas empleadas para su control o erradicación (Ruberson, 1999). Uno de los ejemplos más conocido es el caso de *B. cinerea*, que desarrolló resistencia frente a los ingredientes activos benzimidazoles y dicarbozimidias, implementados en las décadas de setenta y ochenta, respectivamente (Elad, 1990).

Adicional al reporte de resistencia a fungicidas, se presentó una creciente preocupación por los residuos químicos sobre frutas y hortalizas, y a su vez sobre el cuidado del medio ambiente. Esto llevó a que diferentes naciones establecieran directrices gubernamentales en las que se restringía el uso de algunos ingredientes activos. De esta manera, se incentivó positivamente el estudio, desarrollo y uso de métodos alternativos de control, que fueran amigables con el medio ambiente y que garantizaran la calidad e inocuidad de los alimentos (Dickinson & Preece, 1977).

Por consiguiente y con el objetivo de lograr avances significativos en el control biológico de patógenos foliares, fue necesario que las investigaciones de las últimas décadas se concentraran en estudiar a profundidad la diversidad de especies, en entender el ambiente foliar, el proceso de colonización y la dinámica de las poblaciones filosféricas (Andrews, 1990; Beattie & Lindow, 1995; Lindow & Leveau, 2002). Es claro que el control exitoso de los agentes que destruyen las plantas implica tanto el conocimiento profundo de la plaga que se desea combatir como de sus enemigos naturales (Dickinson & Preece, 1977). Desde finales del siglo xx e inicios del XXI, se han llevado a cabo diversos estudios que han profundizado sobre conceptos como el parasitismo y comensalismo, la producción de metabolitos y la antibiosis (Elad, 2003; Heydari & Pessarakli, 2010;

Meyer & Leveau, 2012). Los trabajos anteriormente mencionados han descrito que el control biológico es el resultado de varias formas de interacción que dependen de las condiciones ambientales, del tipo de patógeno (biótrofos o necrótrofos), de la edad y especie de planta hospedera, de las prácticas de manejo cultural, de la aplicación de agroquímicos y del microorganismo antagonista, y de sus mecanismos de acción (Elad, 1990; Fokkema, 1993). Asimismo, dichos trabajos también han reportado un control exitoso similar al obtenido con fungicidas químicos sobre diferentes patógenos foliares importantes como *Erwinia amylovora*, *Colletotrichum capsici*, *Monilia fructicola* y *Botrytis cinerea*, entre otros (Lindow & Brandl, 2003; Sharma, Singh, & Singh, 2009).

Actualmente, gracias al desarrollo y disponibilidad de nuevas herramientas, se ha podido profundizar en el conocimiento de las diferentes comunidades microbianas que viven en la filósfera, en el funcionamiento ecosistémico y en los diferentes mecanismos de control empleados por los agentes de control exitosos (Peñuelas & Terradas, 2014). El avance en otras áreas ha permitido evaluar la toxicología, la compatibilidad de los microorganismos con diferentes agentes químicos y biológicos, y el impacto ambiental por el uso de estos; también, ha sido posible el desarrollo de técnicas moleculares en genómica, metabolómica y proteómica, que han jugado un papel importante, ya que no solo han permitido la caracterización y secuenciación de los genomas completos, sino también han permitido crear marcadores fenotípicos o genotípicos específicos (Wasik & Schiller, 2017; Wheeler & Madeira, 2017). Estos últimos han contribuido de manera significativa en la búsqueda y selección de microorganismos con potencial de uso en el control de fitopatógenos de alto impacto socioeconómico en el mundo (McSpadden-Gardener & Fravel, 2002).

No obstante, a pesar de todos los adelantos científicos que se han logrado hasta ahora en el control de patógenos foliares, aún quedan muchos desafíos y áreas por profundizar. Estas brechas probablemente irán siendo resueltas en la medida en que avance el desarrollo y la disponibilidad de nuevas herramientas, pero que en definitiva permitirán a la comunidad científica continuar con la generación de conocimiento y el desarrollo de tecnologías eficientes y sostenibles para el control de las enfermedades foliares.

Ecología de la filósfera, caulósfera y antósfera

Las plantas están pobladas por microorganismos tanto en la parte aérea como en las partes que se encuentran debajo del suelo, que interactúan entre sí, afectando su desempeño, calidad y productividad (Thapa, Prasanna, Ranjan, Velmourougane, & Ramakrishnan, 2017; Vorholt, 2012). Ruinen (1956) se refirió a la filósfera como la parte aérea de la planta o partes que se encuentra por encima de la tierra, que comprende el tallo (caulósfera), las flores (antósfera), las hojas (filoplano) y los frutos (carpósfera) (tabla 1.1)

(Andrews & Harris, 2000; Shade, Jacques, & Barret, 2017). Estos hábitats albergan múltiples géneros microbianos, cuya cantidad y diversidad depende de factores como la zona climática (templada, tropical, fría, etc.); la época del año; la especie y edad de la planta hospedera; las especies de las plantas que habitan alrededor; el estado fisiológico; la producción de compuestos orgánicos volátiles y el manejo agronómico (Lemanceau et al., 2017; Redford & Fierer, 2009; Vorholt, 2012).

Tabla 1.1. Hábitats microbianos filoféricos asociados a las plantas

Antósfera	Hábitat microbiano asociado a las flores.
Carpósfera	Hábitat microbiano asociado a las frutas.
Caulósfera	Hábitat microbiano asociado a los tallos.
Endósfera	Hábitat microbiano localizado dentro de los tejidos de la planta.
Filósfera	El hábitat microbiano asociado a las hojas, que incluye filoplano y endósfera.

Fuente: Adaptado de Shade et al. (2017)

Dentro de los diferentes nichos que proporcionan las plantas, las hojas constituyen la estructura aérea dominante con aproximadamente 508.630.100 km² de área superficial, que incluye la parte superior e inferior de las hojas y representa un área de aproximadamente el doble de la superficie terrestre (Vorholt, 2012). Adicionalmente, se debe sumar el área disponible del tallo, flores y frutos, que puede ser colonizada por diversos géneros de bacterias, hongos filamentosos y levaduras, tanto epífitos (ubicando sobre la superficie) como endófitos, que colonizan dentro de los tejidos (Andrews, 1992; Arnold, Maynard, Gilbert, Coley, & Kursar, 2000).

La filósfera es considerada un ambiente dinámico y hostil, debido a las rápidas fluctuaciones de temperatura, la exposición a la radiación solar, la competencia por espacio, la contaminación presente en el medio circundante y la escasa disponibilidad de diferentes fuentes de carbono, nitrógeno y agua. Los nutrientes allí presentes determinan la población de

microorganismos que ocupan ese nicho, permitiendo su colonización hasta cuando estos se agotan, lo que implica un cambio en sus atributos funcionales (Martirosyan & Steinberger, 2014; Mercier & Lindow, 2000; Thapa et al., 2017). La cantidad y calidad de nutrientes varía de acuerdo con la posición de la hoja, la edad de la planta y su facilidad de difusión; además, difieren en la superficie foliar, siendo en la zona abaxial de las hojas, en las venas y en las paredes de las células epidérmicas en donde se encuentra la mayor concentración (Andrews, 1992; Lindow & Andersen, 1996). Sin embargo, su disponibilidad también depende de factores como el régimen de humedad y la época del año (Andrews, 1992; Lindow & Brandl, 2003; Yoshida, Hiradate, Koitabashi, Kamo, & Tsushima, 2017). La glucosa, la fructosa y la sacarosa son los azúcares predominantes en la filósfera, aunque puede encontrarse una pequeña cantidad de otros azúcares, como galactosa y otros no identificados. Del promedio de 2,5 µg de azúcares totales por gramo de hoja no colonizada, 1,4 µg equivale a glucosa; no

obstante, estos valores pueden variar dependiendo de la especie de planta y de su estado nutricional (Andrews, 1992; Mercier & Lindow, 2000).

Los nutrientes de origen exógeno (por ejemplo, la ligamaza que es secretada por ciertos insectos que se nutren de la savia de las plantas, del excremento de pájaros e insectos y del polen) influyen sobre las comunidades microbianas que colonizan la filósfera. El efecto que tiene la ligamaza sobre ciertas especies de levaduras, como, por ejemplo, *Sporobolomyces roseus*, es una evidencia de la preferencia que tienen estos microorganismos para colonizar sitios con una elevada concentración de azúcares. Igualmente, se ha establecido que los nutrientes de origen exógeno sirven de alimento para otros insectos que depositan sustratos complejos como polen, que a su vez contribuye no solo el aumento de la disponibilidad de nutrientes en el ambiente, sino que elevan la población microbiana de manera temporal (Andrews, 1992).

Mercier y Lindow (2000) describieron que uno de los factores más limitantes para el crecimiento microbiano sobre la filósfera no es la presencia de nutrientes, sino su disponibilidad, puesto que en sus estudios detectaron la presencia de azúcares residuales en plantas que presentaban una alta población microbiana; estos autores la relacionaron con la alta presencia de agua disponible, que provocaba la difusión de los nutrientes y, en consecuencia, su utilización por los microorganismos.

Las plantas producen endógenamente diversos exudados sobre las hojas que incluyen variedad de carbohidratos, algunos aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, alcoholes, trazas de elementos minerales, vitaminas y hormonas, estimados en rango inferior a 100 µg/mL (Andrews, 1992). Adicionalmente, las plantas tienen la capacidad de sintetizar compuestos orgánicos volátiles (voc, por su sigla en inglés), pertenecientes a los grupos de los fenoles y terpenoides, que no solo cumplen funciones esenciales en ellas, sino que también han sido objeto de estudio por sus posibles usos como fuentes de carbono y por sus propiedades antimicrobianas contra algunas bacterias y hongos fitopatógenos (Abanda-Nkpwatt, Krimm, Coiner, Schreiber, & Schwab, 2006; Andrews, 1992; Jacques, Kinkel, & Morris, 1995). Este tema se amplía en el capítulo 23, sobre los volátiles microbianos (mvoc) y su potencial en el control biológico de fitopatógenos e insectos.

En concordancia con lo anterior, Abanda-Nkpwatt et al. (2006) encontraron que la fresa (*Fragaria ananassa*) produce principalmente compuestos volátiles como el alcohol bencílico y el R/S-linalool liberados en la cutícula y el nonanal en las glándulas tricomas. Por otra parte, Ali, Sorkhoh, Salamah, Eliyas y Radwan (2012) y Al-Awadhi et al. (2012) reportaron el aislamiento de bacterias filosféricas pertenecientes a los géneros *Microbacterium* sp., *Kocuria* sp., *Arthrobacter* sp., *Agrococcus* sp., *Bacillus* sp., *Klebsiella* sp., *Planomicrobium* sp., *Rhodococcus* sp. y *Citrobacter* sp., a partir de diferentes especies de plantas, que emplean hidrocarburos asociados a las hojas de las plantas como fuentes de carbono para su crecimiento.

También se ha descrito que la presencia de ciertos microorganismos epífitos puede afectar la emisión de voc de diferentes maneras, debido a la producción y liberación de volátiles microbianos que se mezclan con los voc y afectan la fisiología vegetal, modifican la producción y emisión de voc, y metabolizan los voc emitidos por las plantas (Farré-Armengol, Filella, Llusia, & Peñuelas, 2016). Autores como Fincheira, Parra, Mutis, Parada y Quiroz (2017) y Al-Awadhi et al. (2012) han descrito que microorganismos como *Bacillus* sp. producen un voc bioactivo, que puede ser empleado para la inducción del crecimiento de especies hortícolas.

La producción de los voc, además de contribuir al crecimiento de algunos microorganismos específicos sobre las hojas, tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de otros, favoreciendo que ciertas poblaciones bacterianas sobresalgan sobre otras. Un ejemplo de este efecto es el reportado por Abanda-Nkpwatt et al. (2006), quienes encontraron que el R-S-linalol inhibe el crecimiento del patógeno *B. cinerea* en concentraciones de 1 a 10 ppm, y a concentraciones superiores de 1.000 ppm puede inhibir completamente el crecimiento de diversos grupos bacterianos. De igual manera, se ha reportado un efecto similar con compuestos como el nonanal y el benzil alcohol, que también hacen parte de los compuestos volátiles emitidos por plantas. Fernando, Ramarathnam, Krishnamoorthy y Savchuk (2005), por su parte, reportaron que volátiles microbianos como el benzotiazol, ciclohexanol, n-decanal, dimetil trisulfuro, 2-etil 1-hexanol y nonanal inhiben el crecimiento micelial y la germinación del patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*.

Para evaluar la biodiversidad microbiana de la filósfera, se debe tener en cuenta que las plantas cubren una significativa porción del globo terrestre y que cada una produce una gran cantidad de hojas que son habitadas, tanto cuantitativa como cualitativamente, por diversos agregados microbianos. Autores como Hirano y Upper (2000) y Lindow y Andersen (1996) han destacado la importancia de este ecosistema, mediante estudios en los que se ha evidenciado que cada hoja de una planta puede soportar una carga microbiana de aproximadamente 1 a 10 millones de microorganismos/cm², y que cada especie vegetal tiene la capacidad de atraer diferentes especies de microorganismos colonizadores, debido a la producción de diferentes exudados y compuestos volátiles.

La adherencia de los microorganismos a las hojas inicia una vez estos entran en contacto con la superficie foliar, en donde, inicialmente, se presenta una serie de fuerzas fisicoquímicas no específicas pero irreversibles, debido a que el balance entre las fuerzas atractivas de London Van der Waals y las fuerzas electrostáticas es de repulsión; por esta razón, el primer balance de fuerzas entre los microorganismos y las hojas es débil a determinada distancia. No obstante, las interacciones hidrofóbicas o uniones químicas presentes entre las dos superficies pueden resultar en una fuerte adherencia en esta primera fase del proceso (Buck & Andrews, 1999).

La segunda fase se caracteriza por ser dependiente del tiempo y frecuentemente específica. En esta etapa, muchos microorganismos tienen la capacidad de producir polisacáridos extracelulares (EPS, por su sigla en inglés) para formar biopelículas que los mantengan adheridos a la superficie foliar y que les proporcionen resistencia frente a condiciones de estrés, cambios metabólicos y enemigos potenciales (Lindow & Brandl, 2003; Morris et al., 1998).

En cuanto a la distribución de los microorganismos sobre la filósfera, Hirano y Upper (2000) reportaron que estos se ubican principalmente sobre la superficie de la epidermis y en los espacios intracelulares (apoplastos) del mesófilo, sin penetrar las células de las plantas. Por otro lado, Andrews y Harris (2000) describieron que los microorganismos colonizan principalmente los estomas o apoplastos, porque pueden evitar la radiación solar, y las glándulas

tricomas, porque les proporcionan los nutrientes necesarios para su desarrollo; también se han reportado microorganismos que, como mecanismo de supervivencia, desarrollaron capacidad de alterar la superficie en la que se encuentran, mediante la producción de compuestos microbianos con propiedad surfactante.

Entre los microorganismos con potencial biocontrolador que se han podido recuperar a partir de la superficie de las hojas, se han reportado bacterias de los géneros *Bacillus* spp., *Cichorium* sp., *Pseudomonas* spp., *Methylobacterium* sp., *Erwinia* spp., *Xanthomonas* spp., *Chromobacterium* spp. y *Klebsiella* spp. (Campbell, 1989; Fincheira et al., 2017; Hirano & Upper, 2000; Jacques et al., 1995), hongos de los órdenes Mucorales, Tremellales, Filobasidiales, Sporidobolales, Polyporales, Auriculariales, Agaricales, Xylariales, Trichosphaeriales, Sordariales, Magnaporthales, Hypocreales, Glomerellales, Diaporthales, Chaetosphaeriales, Helotiales, Chaetothyriales, Pleosporales y Capnodiales (Izuno et al., 2016).

Dentro del grupo de hongos, se ha podido establecer que la superficie de las hojas se caracteriza por ser colonizada principalmente por una diversidad de levaduras, algunas comúnmente rosadas o rojas de los géneros *Rhodotorula* spp. y *Sporobolomyces* spp., y otras de color blanco del género *Cryptococcus* spp. (Buck & Andrews, 1999; Campbell, 1989). También se han reportado levaduras pertenecientes al género de *Candida* spp., *Pichia* spp., *Torulopsis* sp., *Aureobasidium* sp., *Sporobolomyces* spp. y *Tapian* sp. (Atlas & Bartha, 2002; Campbell, 1989; Inácio, Rodrigues, Sobral, & Fonseca, 2004; Wang & Bai, 2004), además de los hongos *Aureobasidium pullulans* y *Cladosporium* spp. (Campbell, 1989).

La colonización de la filósfera ocurre en función del inóculo disponible, del ambiente y del hospedero. Inicialmente, se ha reportado una mayor población bacteriana, seguida por un aumento en el número de levaduras y, finalmente, un incremento en la población de hongos filamentosos; sin embargo, este patrón puede verse influenciado por el grado de infestación de insectos, las prácticas de cultivo y eventos climáticos como precipitaciones, radiación, temperatura y humedad (Andrews, 1992; Yang, Crowley, Borneman, & Keen, 2001).

En términos espaciales, el patrón de colonización sobre las hojas es heterogéneo. Los sitios de mayor concentración están a lo largo de las venas y en las ranuras de las paredes de las células epidérmicas, posiblemente por la concentración de nutrientes, la retención de agua y como mecanismo de protección frente a la erosión. Autores como Andrews (1992) han descrito que, después de 30 horas posteriores a la colonización, las bacterias se concentran sobre las paredes anticlinales a lo largo de las venas, estomas y cerca de las glándulas, mientras que las levaduras se ubican en las paredes anticlinales, principalmente sobre la lámina o limbo.

En trabajos realizados por ecologistas microbianos, dedicados a investigar la diversidad de los microorganismos presentes en la superficie de las hojas y sus interacciones, se ha reportado la existencia de más de 85 especies de microorganismos diferentes presentes en 37 géneros de plantas como, por ejemplo, centeno, aceituna, remolacha y trigo (Yang et al., 2001). Además de los factores ya mencionados, que intervienen en la colonización de la superficie foliar y, por ende, en la biodiversidad, se debe tener en cuenta que el proceso de colonización implica una dinámica de inmigración, emigración, crecimiento y muerte de los microorganismos, así como el grado de multiplicación de estos para mantener una alta población que garantice su supervivencia (Jacques et al., 1995).

Por otra parte, el inóculo microbiano que se encuentra presente en el aire y que sirve como fuente de inmigración hacia nuevas hojas es crucial para la colonización de la filósfera. Esto fue demostrado por Jacques et al (1995), quienes evaluaron las diferentes edades y posiciones de las hojas respecto a los microorganismos presentes en ellas y su relación con los microorganismos presentes en el aire. Dichos autores reportaron que estos dos factores influyen tanto en la densidad de la población como en la diversidad, siendo las hojas viejas las que soportan una mayor cantidad de microorganismos en relación con las hojas nuevas; además, la población microbiana va aumentando conforme aumenta la edad de la planta; asimismo, encontraron que las hojas internas contienen una menor densidad de microorganismos que las hojas que se encuentran ubicadas en la parte externa.

Posteriormente, Lindow y Andersen (1996) encontraron que, así como la posición de las hojas es crucial

para determinar el índice de la diversidad poblacional de los microorganismos, la ubicación del cultivo también juega un papel clave. Dichos autores evaluaron la influencia de inmigración sobre hojas de naranja Navel y encontraron que la presencia de otras especies de plantas alrededor del cultivo estuvo relacionada con una mayor diversidad de microorganismos con respecto a las que se encontraban rodeadas solamente por plantas de la misma especie.

El aire no es la única fuente de inmigración de microorganismos, ya que la actividad de insectos como vectores tiene una gran influencia. Además, esta inmigración se ve afectada por la dirección, la velocidad y la capacidad de carga del viento. Por otra parte, se debe tener en cuenta que la eficiencia de liberación de microorganismos es baja, lo que hace necesario recorrer una mayor cantidad de área foliar que permita recuperar un número suficiente de microorganismos para transportar (Lindow & Andersen, 1996).

Los microorganismos liberados a partir de las plantas aparentemente pueden mantenerse viables por períodos de tiempo suficientes como para ser transportados más de 100 m, y la capacidad de carga de células microbianas inmigrantes puede ser aproximadamente de 1.000 células por día. No obstante, este valor no garantiza la capacidad de colonización de la superficie foliar, ya que depende también de las características de las células inmigrantes de mantener la viabilidad frente a las condiciones de estrés encontradas durante su transporte (Lindow & Andersen, 1996).

Una vez transportadas las células y depositadas en las nuevas hojas, los diferentes microorganismos deben tener la capacidad de mantener su población frente a las nuevas condiciones. Esto se debe a que no todas las especies de plantas proporcionan las mismas características, encontrándose que especies de plantas como las cítricas y los árboles de oliva soportan relativamente una menor población microbiana comparadas con otras. La razón por la cual se presenta esta diferencia no es clara hasta el momento, pero se relaciona con la presencia de una cutícula cerosa gruesa, que puede limitar la difusión de nutrientes dentro de la hoja, afectando así la multiplicación de los microorganismos (Lindow & Andersen, 1996).

Los microorganismos epífitos están directa y constantemente expuestos a factores abióticos extremos como,

por ejemplo, períodos de desecación, temperaturas muy altas o muy bajas, además de estar expuestos a los rayos solares, siendo estos los principales factores que generan estrés celular y afectan la supervivencia de las diversas poblaciones de microorganismos que habitan la filósfera (Truchado, Gil, Reboleiro, Rodelas, & Allende, 2017).

La radiación solar incluye la luz visible, la radiación ultravioleta (UV) y la radiación infrarroja (Lindow, Hecht-Poinar, & Elliott, 2004). La radiación solar que alcanza a penetrar la atmósfera terrestre se subdivide según su longitud de onda en UV-A (320-400 nm) y UV-B (280-320 nm), siendo esta última la de mayor energía y la que causa el efecto inhibitorio y daños directos en el ADN de los microorganismos. Por su parte, la UV-A causa daños indirectos al ADN, debido a la formación de especies reactivas de oxígeno que interactúan con el ADN y ocasionan la ruptura de las proteínas (Jacobs & Sundin, 2001).

Los rayos UV no producen iones inestables o radicales libres que interactúen con la materia viva de forma destructiva, porque no tienen actividad ionizante; sin embargo, sí pueden inactivar macromoléculas, debido a los cambios que causan en las moléculas absorbentes y que le dan origen a los fotoproductos que causan la inactivación (Atlas & Bartha, 2002; Iáñez, 1998). Por otro lado, la inactivación de proteínas o del ARNm en general no produce efectos de letalidad, ya que existen muchas copias de cada uno de estos tipos de macromoléculas y se pueden volver a sintetizar. En contraste, la inactivación del único cromosoma de la bacteria tiene efectos letales primarios y efectos mutagénicos secundarios (Iáñez, 1998).

Autores como Iáñez (1998) y Jacobs y Sundin (2001) han reportado que los fotoproductos generados en el ADN por los rayos UV se derivan principalmente de alteraciones en las bases pirimidínicas (citosina, timina). Estas alteraciones dan origen a la formación de fotoproductos como pirimidina (6-4) pirimidinona y el ciclobutano pirimidina. De ahí que las lesiones del ADN resulten en un bloqueo en la replicación de este y en la transcripción del ARN, llegando a ser letal en células que no cuenten con un mecanismo eficiente de reparación.

Por otro lado, se presentan diferentes sensibilidades frente a la radiación UV entre los diferentes microor-

ganismos que habitan la filósfera. Se ha reportado que diversas especies de hongos y bacterias han desarrollado estrategias adaptativas contra la irradiación. Autores como Atlas y Bartha (2002) reportaron que los microorganismos que evidencian mayor crecimiento tienen la capacidad de producir pigmentos o desarrollaron una pared celular especializada que les sirve para protegerse, así como otras características que les permiten resistir a estas condiciones ambientales adversas. También pueden evadir las condiciones adversas ubicándose en sitios de sombra o dentro de glándulas o cavidades estomáticas (Atlas & Bartha, 2002; Jacobs & Sundin, 2001; Yoshida et al., 2017).

Diversos estudios de taxonomía numérica desarrollados para identificar la diversidad de los microorganismos que están presentes en filoplano han determinado que las bacterias que habitan las hojas de los pinos son más eficientes en la utilización de azúcares y alcoholes como fuentes de carbono, que las poblaciones que viven en las capas del mantillo. En contraste, las poblaciones bacterianas del mantillo tienen mayor actividad lipolítica y proteolítica que las bacterias que habitan en los pinos. Este resultado demuestra que la alta diversidad de especies de plantas está relacionada con una alta diversidad de microorganismos, muchos de los cuales podrían tener un alto potencial agroindustrial (Atlas & Bartha, 2002).

Entre las poblaciones microbianas de la superficie de las plantas ocurren interacciones positivas y negativas. Un ejemplo de estas es el crecimiento de levaduras osmofílicas que tienen la capacidad de disminuir la concentración de azúcares, haciendo que el hábitat sea más adecuado para la invasión por otras especies. Asimismo, las levaduras que habitan la superficie de los frutos pueden producir ácidos grasos insaturados que inhiben el desarrollo de poblaciones bacterianas grampositivas, mientras que otras bacterias presentes en este mismo hábitat utilizan para su desarrollo factores de crecimiento como la tiamina y el ácido nicotínico, producidos por las levaduras; entre tanto, las levaduras utilizan para su crecimiento metabolitos producidos por algunas bacterias presentes en la filósfera (Atlas & Bartha, 2002).

En el caso de los hongos filósfericos, estos también pueden competir por nutrientes y espacio, además de parasitar a otros microorganismos, producir antibióticos

para limitar su desarrollo o usar interacciones sinérgicas —como las arriba descritas— para colonizar la superficie foliar (Lindow & Brandl, 2003).

Aunque los microorganismos antagonistas han surgido como una alternativa promisoriosa para reducir el uso de fungicidas químicos en el control de enfermedades (Moretto, Cervantes, Batista, & Kupper, 2014), su efectividad es variable y depende de factores como la dosis aplicada sobre la filósfera; la especie de la planta a la que se aplica; la aplicación de productos químicos como fertilizantes, fungicidas o insecticidas que favorecen la proliferación de una población específica; la presencia de metabolitos producidos por plantas u otros microorganismos, y factores abióticos como temperatura, radiación, disponibilidad de agua y nutrientes (Wang, Xue, Han, Bu, & Liu, 2014; Zhang et al., 2008a).

Por otra parte, el desarrollo de agentes biocontroladores también se ve limitado, debido a que estos frecuentemente son incapaces de controlar las infecciones ya establecidas, muchas de ellas causadas por patógenos quiescentes (Ippolito & Nigro, 2000). No obstante, la eficiencia de un agente de control biológico podría ser mejorada al integrarlos con el control químico dentro de una estrategia de manejo integrado, por lo que se ha propuesto la utilización de agentes biológicos junto con los fungicidas que sean compatibles o que puedan usarse secuencialmente (Errampalli & Brubacher, 2006; Shtienberg & Elad, 1997).

Esta estrategia ofrecería no solo la oportunidad de reducir la cantidad de fungicida aplicado tanto en pre como en poscosecha, sino también el nivel de residuos tóxicos en los productos comercializados (Ippolito & Nigro, 2000).

Principales agentes de control biológico de fitopatógenos foliares

Desde 1950, cuando se iniciaron algunos ensayos tendientes al control biológico de fitopatógenos foliares, son muchos los microorganismos que se han utilizado; tal es el caso de *Fusarium* spp. y *Penicillium claviforme*, aislados del cultivo de lechuga para evitar el establecimiento primario de *Botrytis cinerea* (Newhook, 1951; Wood, 1951). *Cladosporium herbarum* controló el moho gris en fresa cuando se protegieron las flores bajo condiciones de campo (Bhatt & Vaughan, 1962). Varios hongos como *Alternaria alternata* y *Cladosporium cladosporioides* controlaron *S. sclerotiorum* en varios cultivos (Boland & Hunter, 1988; Whipps et al., 1993). *Trichoderma hamatum* redujo el moho gris de la vaina del frijol, ocasionada por *B. cinerea* (Nelson & Powelson, 1998). Algunas especies de levaduras y bacterias también han sido reportadas como efectivas en el control de *B. cinerea* en frijol y tomate (Elead, Köhl, & Fokkema, 1994b; Redmond, Marois, & MacDonald, 1987). Por ejemplo, *Bacillus brevis* redujo en un 64-71% el moho gris de la col china (Edwards & Seddon, 1992). Muchos otros microorganismos se han utilizado para controlar enfermedades foliares; sin embargo, se destacan la bacteria *Bacillus subtilis* y los géneros fúngicos

Trichoderma, *Ampelomyces* y *Rhodotorula*, siendo *Trichoderma* spp. el microorganismo más utilizado, principalmente para el control de *B. cinerea* en uva (Dubos, 1992; O'Neill et al., 1996) y fresa (Tronsmo & Dennis, 1977).

Hongos en el control biológico de patógenos foliares

A continuación, se ampliará la información sobre varios de los hongos, tanto filamentosos como levaduras utilizados en el control biológico de patógenos foliares.

Hongos filamentosos

Trichoderma spp.

El género *Trichoderma* (Hypocreales, Ascomycota) incluye alrededor de 104 especies basadas en análisis moleculares. Varias de estas corresponden, en su fase sexual, a *Hypocrea* (Druzhinina, Kopchinskiy,

& Kubicek, 2006; International Subcommission on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy [ISTH], 2017). Este género es un habitante del suelo (figura 1.8), cosmopolita, capaz de crecer en suelos nativos de pradera, de agricultura, de bosques, salinos, de desierto y en pantanos de todas las zonas climáticas (incluidas la Antártida, la tundra y las regiones tropicales); también se encuentran en lagos, en el aire, en la biomasa de plantas, en la vecindad de casi todos los tipos de especies de plantas vivas y en semillas (Mukherjee, Horwitz, Singh, Mukherjee, & Schmoll, 2013).

Además, se encuentran con frecuencia en la madera en descomposición (Samuels, 1996), y es económicamente importante como productora de enzimas industriales (*Trichoderma reesei*) (Kubicek & Penttila, 1998), de antibióticos (Sivasithamparam & Ghisalberti, 1998) y como biocontrolador de diversos fitopatógenos (Elad, 2000a; Harman, Howell, Viterbo, Chet, & Lorito, 2004), ya que puede crecer en asociación simbiótica/endofítica con las plantas para protegerlas de factores bióticos y abióticos (Mastouri, Björkman, & Harman, 2010; Shores, Harman, & Mastouri, 2010).

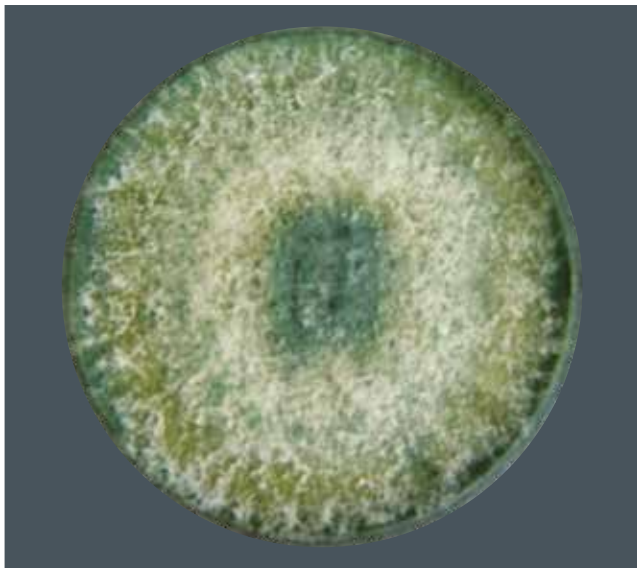
Este hongo ha demostrado ser resistente/tolerante a muchos plaguicidas utilizados en la agricultura (Chaparro, Carvajal, & Orduz, 2011; Goldman et al., 1993; Mukherjee, Sherkhane, & Murthy, 1999). Además, *Trichoderma* spp. es un fuerte invasor oportunista, de crecimiento rápido y prolífico productor de esporas (Schuster & Schmoll, 2010). Todas estas razones lo sitúan como un hongo ideal tanto para aplicaciones industriales como para su uso como bioplaguicida. La actividad biocontroladora de varias especies de *Trichoderma* ha sido ampliamente documentada (Elad, 2000a; Lorito, Woo, Harman & Monte, 2010; Moreno & Cotes, 2006; Moreno et al., 2007; Shores et al., 2010).

Son varios los ejemplos de control exitoso que se han logrado con el uso de la cepa T39 de *Trichoderma harzianum*, que puede considerarse como un modelo para el control de patógenos foliares, principalmente de *B. cinerea*, dada la gran cantidad de investigaciones realizadas con este microorganismo (Elad, 1994; Elad, 2000a; Elad & Freeman, 2002; Elad & Shtienberg, 1995; Elad & Stewart, 2004; Elad et al., 1993b; Freeman et al., 2004; Guetsky et al., 2001; O'Neill et al., 1996;

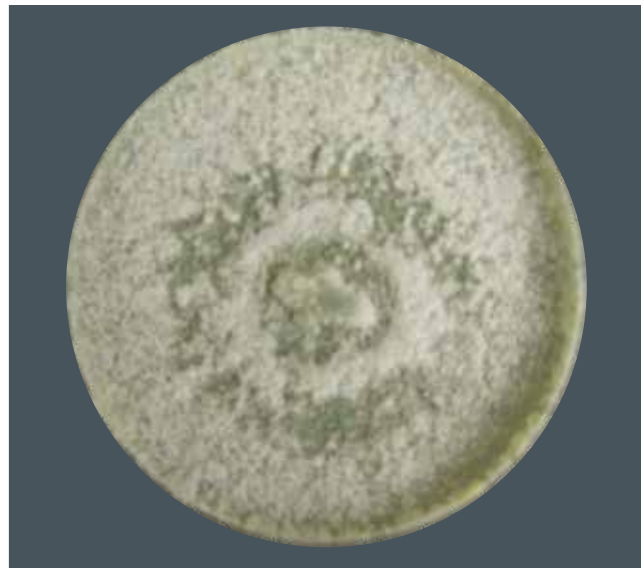
Paulitz & Bélanger, 2001; Perazzolli et al., 2008; Shafir et al., 2006). Esta cepa fue aislada del dosel del pepino (Elad, Zimand, Zaq, Zuriel, & Chet, 1993a).

Debido al trabajo intensivo llevado a cabo en condiciones comerciales en el control moho gris de la vid (Elad, 1994; Elad & Shtienberg, 1995) y dado el control eficaz de *B. cinerea* en invernadero en diferentes cultivos en Israel (Elad, 1994; Elad & Zimand, 1991; Elad & Zimand, 1992) y en muchos otros países (Elad, 1994), esta cepa fue registrada bajo el nombre de Tricodex para el control de *B. cinerea* en campo (O'Neill et al., 1996) y en invernadero (Shtienberg & Elad, 1997), ya sea actuando sola o de forma integrada con fungicidas. Este aislamiento también mostró ser efectivo contra otras enfermedades como la cladosporiosis del tomate (*Fulvia fulva*) y el moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum*) en varios cultivos, incluido el pepino (Elad & Shtienberg, 1997). En varios estudios de invernadero y campo se demostró su actividad biocontroladora, como en el caso de trabajos realizados en el control de *B. cinerea*, *Pseudoperonospora cubensis* y *Sphaerotheca fusca* (sinónimo de *Sphaerotheca fuliginea*) en pepino, en condiciones comerciales de invernadero, en los que se obtuvieron porcentajes de control entre 35 y 78 % (Elad, 2000a). Cuando se evaluó en experimentos a gran escala usando diferentes frecuencias y dosis de aplicación, controló la antracnosis producida por *Colletotrichum acutatum* y por el moho gris (*B. cinerea*) en fresa, bajo condiciones controladas y en condiciones de invernadero (Freeman et al., 2004). En otros estudios, se demostró el efecto biocontrolador de *T. harzianum* T39 en el control preventivo del mildew velloso de la vid, producido por *Plasmopara viticola*, bajo condiciones de invernadero, lográndose protección superior al 40 %, mediada por resistencia sistémica inducida (Perazzolli et al., 2008).

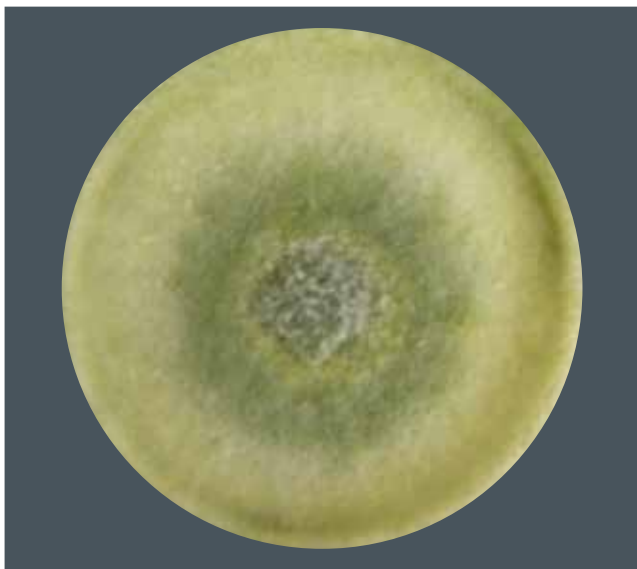
Otras especies de *Trichoderma* han sido utilizadas exitosamente para el control de patógenos foliares económicamente importantes; tal es el caso de *Trichoderma atroviride*, que ha sido utilizado para el control de *Cryphonectria parasitica* y de *B. cinerea* (Brunner et al., 2005; Dodd, Lieckfeldt, & Samuels, 2003). *Trichoderma koningiopsis* cepa Th003, aislada de suelo colombiano (previamente identificada como *Trichoderma koningii*), también ha producido un control efectivo de *B. cinerea* en tomate (Moreno & Cotes, 2006; Moreno et al., 2007) y mora (Zapata,



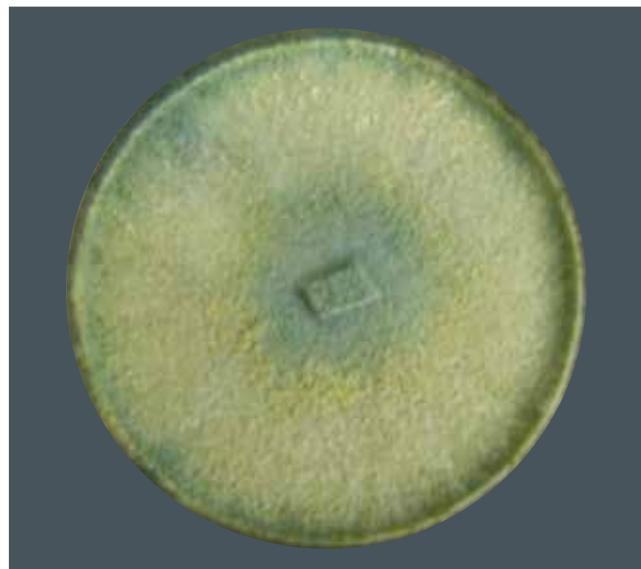
Trichoderma asperellum



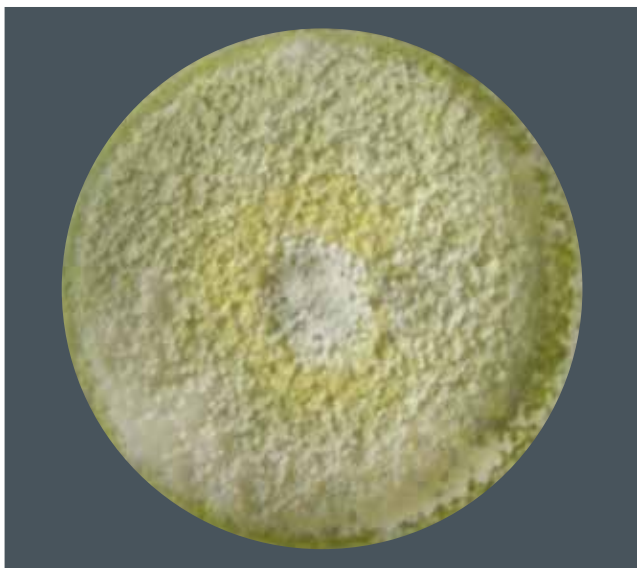
Trichoderma atroviride



Trichoderma harzianum



Trichoderma koningiopsis

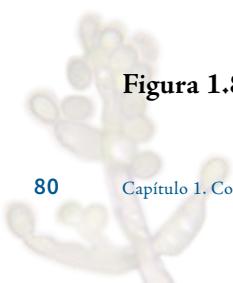


Trichoderma longibrachiatum



Trichoderma spirale

Figura 1.8. Aspecto macro y microscópico de varias especies de *Trichoderma* aisladas de suelo colombiano.



Acosta, Díaz, Villamizar, & Cotes, 2011); del mildew polvoso en tomate (Moreno & Cotes, 2006), y del moho blanco de la lechuga (Cotes et al., 2007). Otras cepas de *Trichoderma* spp. han sido también utilizadas para el control de *Alternaria solani*, *Bipolaris oryzae*, *Pyricularia oryzae*, *Sphaerulina oryzina* (syn. *Cercospora janseana*, *Cercospora oryzae*) y *S. sclerotiorum* en tomate, papa y arroz (Prabhakaran, Prameeladevi, Sathiyabama, & Kamil, 2015). Por su parte, *T. afroharzianum*, en evaluaciones de campo a gran escala, produjo una reducción de la severidad de 43 % del mildew polvoso producido por *Erysiphe necator* en cultivos de vid; además, mostró una alta tolerancia a los fungicidas comúnmente utilizados para el manejo de esta enfermedad (Sawant et al., 2017). *T. stromaticum*, en ensayos de campo en Perú, redujo en 48 % la escoba de bruja producida por *Crinipellis pernicioso* en el cultivo de cacao; sin embargo, este microorganismo no tuvo un efecto contra las enfermedades pudrición negra del fruto y moniliasis causadas por *Phytophthora* spp. y *Moniliophthora roreri*, respectivamente, en este cultivo (Krauss & Soberanis, 2002).

Ampelomyces quisqualis

Ampelomyces quisqualis es un hongo picnidial, Ascomycota, de la clase Dothideomycetes, orden Pleosporales y familia Phaeosphaeriaceae, que se encuentra comúnmente parasitando mildews polvosos. A pesar de haberse descrito 18 especies, todas han sido mencionadas con *A. quisqualis* como sinónimo (Index Fungorum [IFS], 2017). Pintye et al. (2012) encontraron que *A. quisqualis sensu lato* está compuesto por varias especies crípticas reflejadas en clados claros en árboles filogenéticos, con diferencias de secuencia más allá de los límites de las especies. Estas especies crípticas son, sin embargo, morfológicamente indistinguibles y sus rangos de hospederos se superponen totalmente. Por lo tanto, en la actualidad se está desarrollando un proyecto para aclarar la nomenclatura y la taxonomía de estas especies, ya que hay 18 especies reportadas, que no son distinguibles basados en su morfología (Dayarathne et al., 2016).

Este hongo puede crecer de manera saprófita durante cortos períodos, pero tiene pocas posibilidades de sobrevivir durante períodos más largos en ambientes

naturales sin parasitar al mildew polvoso, ya que requiere agua para germinar y para infectar colonias del patógeno. Las infecciones pueden ocurrir en menos de 24 horas a 25 °C (Kiss, Russell, Szentiványi, Xu, & Jeffries, 2004; Sundheim & Krekling, 1982). *A. quisqualis* invade y crece sobre el mildew polvoso, volviendo opacas, aplanadas y de color blanco a gris las colonias del patógeno (Hashioka & Nakai, 1980).

Ampelomyces spp. ha sido reportado en más de 65 especies vegetales (ocho géneros) de Erysiphaceae en todo el mundo; por ejemplo, ha sido reportado por Hino y Kato (1929), Belsare, Moniz y Deo (1980), Hijwegen y Buchenauer (1984), Tsay y Tung (1991), Kiss (1997, 1998). Sus interacciones con las plantas huéspedes y el mildew polvoso lo han convertido en uno de los caos más evidentes de relaciones tritróficas en la naturaleza, aunque su estudio ha recibido poca atención en la ecología de hongos y plantas hasta ahora (Kiss et al., 2004).

El primer ensayo significativo de control biológico utilizando *Ampelomyces* fue llevado a cabo por Jarvis (1977). Desde entonces, ha habido muchos otros ejemplos positivos donde *Ampelomyces* se ha utilizado para controlar una amplia gama de mildews polvosos en varios cultivos. Todos estos estudios allanaron el camino para la comercialización del producto desarrollado denominado AQ10 (Daoust & Hofstein, 1996; Hofstein, Daoust, & Aeschlimann, 1996).

Muchos trabajos han demostrado resultados positivos al evaluar *A. quisqualis* para el control de *Podosphaera leucotricha* en manzana, *Sphaerotheca* sp. en grosella negra, *Erysiphe communis* en remolacha, *Erysiphe umbelliferarum* y *Oidium* sp. en zanahoria, *Sphaerotheca* spp. en Cucurbitáceas, *Uncinula necator* en vid, *Oidium mangiferae* en mango, *Phyllactinia suffulta* en morera, *Leveillula taurica* en pimiento, *S. pannosa* en rosa, *Sphaerotheca macularis* f. sp. *fragariae* en fresa y *Erysiphe betae* en remolacha azucarera, entre otros (Kiss et al., 2004). Al respecto, Caffi, Legler, Bugiani y Rossi (2013) demostraron que las aplicaciones de *A. quisqualis* en viñedos, antes y después de la cosecha, redujeron la formación de ascocarpos del patógeno (chasmotecios), mientras que Legler, Caffi, Kiss, Pintye y Rossi (2011) y Legler et al. (2016) describieron la selección de una nueva cepa de *A. quisqualis* con parasitismo mejorado de chasmotecios de *Erysiphe necator*.

Otros hongos filamentosos

Otros mohos han sido utilizados en diversos cultivos; tal es el caso de los usados en el control biológico del patógeno causante de la costra negra en caucho: *Phyllachora huberi* (*Hevea brasiliensis*), en el que se utilizaron los hiperparásitos *Cylindrosporium concentricum* y *Dicyma pulvinata* (Junqueira & Gasparotto, 1991). Asimismo, utilizando *Clonostachys rosea* (antes *Gliocladium roseum*), se logró controlar el tizón de la hoja producido por *Botrytis squamosa* en cebolla (Sutton & Peng, 1993b) y *B. cinerea* en fresa (Peng, Sutton, & Kevan, 1992) y en rosa (Morandi, Sutton, & Maffia, 2000). Otros ejemplos del uso de este hongo incluyen el control de mildes y enfermedades de césped (Sutton & Peng, 1993a; 1993b).

En otros trabajos se han utilizado los microorganismos *C. rosea*, *Penicillium* sp., *T. viride* y *C. gloeosporioides* en el control de *B. cinerea* en fresas (Peng & Sutton, 1991; Peng et al., 1992; Sutton & Peng, 1993b), así como *Gliocladium catenulatum*, vendido bajo el nombre comercial de Prestop®, que eficientemente controla *Botrytis* y otros hongos (McQuilken, Gemmell, & Lahdenperä, 2001) y *Lecanicillium lecanii*, *Microdochium nivale*, *Typhula idahoensis* y *Cladosporium cladosporioides*, utilizados para el control de *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, agente causal de la roya amarilla o estriada del trigo (Torres et al., 2017; Zhan et al., 2014).

Asimismo, Cullen, Berbee y Andrews (1984) evaluaron el potencial de *Chaetomium globosum* para el control de la sarna del manzano, producida por *Venturia inaequalis*, encontrando que las aplicaciones semanales solo redujeron la enfermedad en un 20%, haciendo poco promisorio este microorganismo para su desarrollo comercial. En contraste con la aplicación de *Athelia bombacina* (sinónimo *Microsphaeropsis ochracea*), se logró una reducción del inóculo primario del patógeno entre 60 y 100%, dependiendo de la cantidad de inóculo biocontrolador utilizado (Carisse & Rolland, 2004; Heye, 1982; Miedtke & Kennel, 1990; Young & Andrews, 1990).

Levaduras

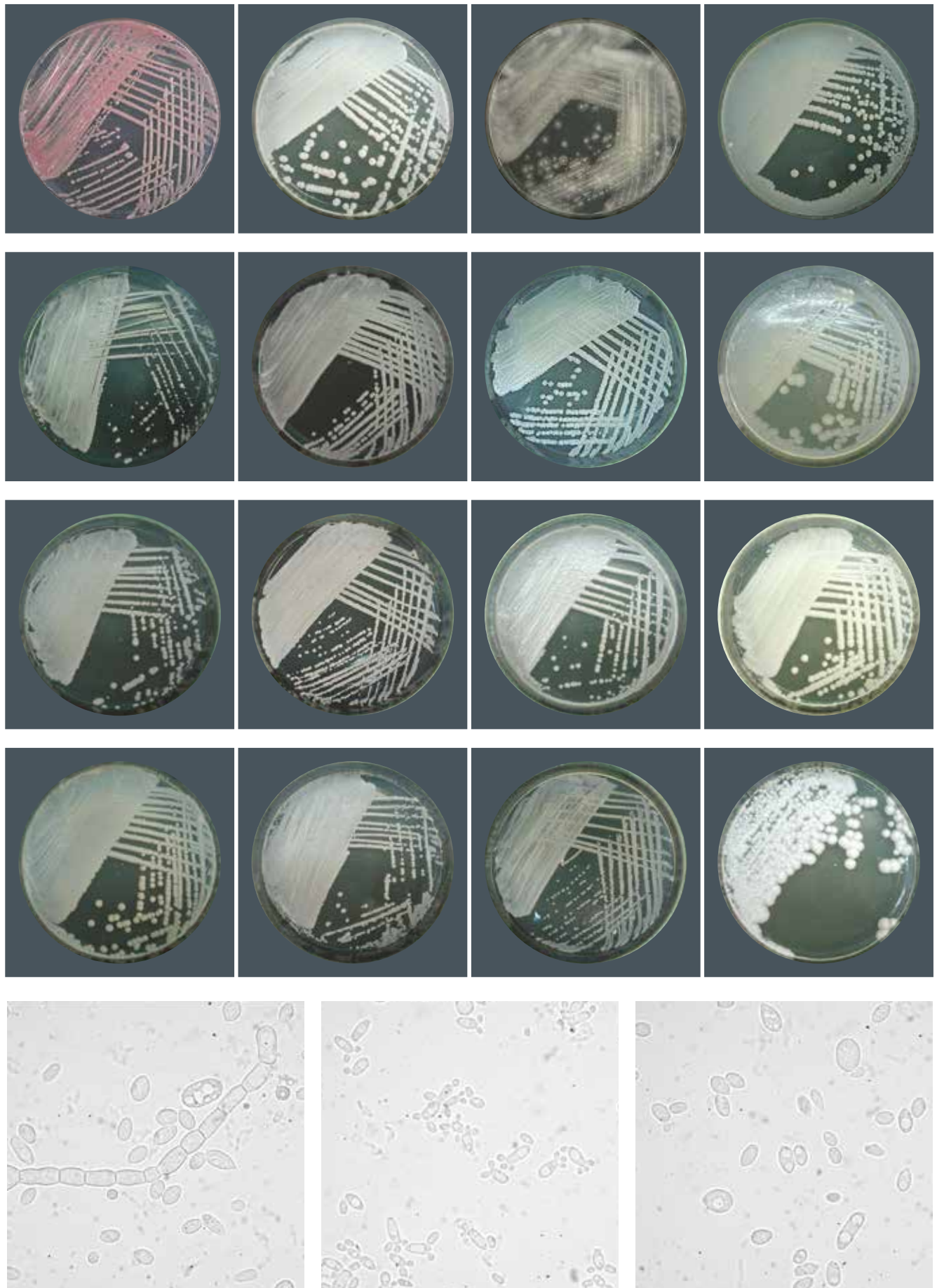
Varias levaduras epífitas que colonizan diferentes superficies planas (Fernández, Mestre, Marchelli, &

Fontenla, 2012; Pusey, Stockwell, & Mazzola, 2009) (figura 1.9) tienen actividad biocontroladora, ya que proporcionan una barrera natural contra ciertos fitopatógenos (Avis, Caron, Boekhout, Hamelin, & Bélanger, 2001; Jacobsen, 2006; Robiglio, Sosa, Lutz, Lopes, & Sangorrín, 2011). Estas generalmente producen polisacáridos extracelulares, que al parecer las ayudan a sobrevivir en superficies de las plantas; también pueden metabolizar una amplia variedad de fuentes de nutrientes y tolerar una variedad de fungicidas basados en productos químicos (Buck & Burpee, 2002), características que pueden contribuir a su utilidad como agentes de biocontrol. Sin embargo, a pesar de que se han utilizado muchas levaduras, son limitados los ejemplos en los que se ha llegado al desarrollo de productos o de prototipos de bioplaguicida para su uso condiciones de precosecha en campo. A continuación, se mencionarán algunos ejemplos relevantes.

Pseudozyma spp.

Pseudozyma es un pequeño grupo de hongos similares a levaduras, clasificados dentro de los Basidiomycetes Ustilaginales (Boekhout, 1995). En su mayoría son epífitas o saprófitas y no son patógenas para las plantas y animales (incluyendo insectos) (Avis & Bélanger, 2002). *P. flocculosa* se aisló por primera vez como un antagonista del mildew polvoso en condiciones ambientales diferentes. Los trabajos posteriores mostraron que era igualmente efectivo contra *Sphaerotheca pannosa* var. *rosae* y *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*, que son responsables del mildew polvoso de la rosa y el trigo, respectivamente (Hajlaoui & Bélanger, 1991; 1993).

P. rugulosa y *P. flocculosa* se han reportado por su actividad biocontroladora contra los diferentes mildes con los que están asociadas (Hammami, Castro, Rémus-Borel, Labbé, & Bélanger, 2011). *P. flocculosa*, por ejemplo, no penetra las células del patógeno, pero secreta un ácido graso inusual que tiene un efecto antibiótico contra el mildew y otros patógenos (Avis et al., 2001). *Pseudozyma aphidis*, que normalmente se encuentra en secreciones de áfidos, también se ha encontrado en la filósfera; esta es un pariente cercano del agente de biocontrol *P. rugulosa* (Begerow, Bauer, & Boekhout, 2000), que también es capaz de producir colapso del mildew del



Fotos: Grupo de Control Biológico de Corpoica

Figura 1.9. Aspecto macro y microscópico de varias cepas de levaduras aisladas de la filósfera de mora.



pepino (*Podosphaera xanthii* anteriormente *Sphaerotheca fuliginea*), ya que prolifera en el tejido infectado y produce hifas largas que parasitan las esporas e hifas del patógeno como un ectoparásito, lo que se traduce en una eficacia del 75 % (Gafni et al., 2015).

Rhodotorula spp.

Rhodotorula es una levadura común en el medio ambiente, ya que se encuentra en aire, suelo, aguas dulces de lagos, lagunas y ríos, y en el agua de mar (amplia distribución en la naturaleza). Su clasificación taxonómica es la siguiente: pertenece a la división Basidiomycota, clase Microbotryomycetes, orden Sporidiobolales y familia Sporidiobolaceae. Su teleomorfo pertenece al género *Rhodospiridium* (Hoog & Guarro, 1995; Larone & Howard, 1996).

R. glutinis tiene la capacidad de colonizar múltiples sustratos naturales (residuos agrícolas) y artificiales, debido a que puede crecer en una variedad de fuentes de carbono como glucosa, sacarosa y lactosa; además, presenta capacidad de adaptarse a ambientes extremos como aguas residuales de refinera (Aksu & Eren, 2007), yacimientos arqueológicos (Guamán-Burneo & Carvajal-Barriga, 2009), glaciares y ambientes ácidos (Libkind, 2007). *R. glutinis* ha sido aislado en reducidos casos de muestras clínicas y considerado como un patógeno emergente oportunista, dado que puede causar infecciones (fungemia) en pacientes inmunocomprometidos (Tuon & Costa, 2008).

La levadura antagonista, *Rhodotorula glutinis*, es un componente importante de la comunidad microbiana epífita en las superficies de las frutas y hortalizas (Elmer & Reglinski, 2006), y se ha propuesto para el control biológico del moho gris en manzana (Zhang et al., 2009), en fresa (Zhang et al., 2010; Zhang et al., 2007), en durazno (Zhang et al., 2008b), en pera (Zhang et al., 2008a) y en mora (Zapata et al., 2011; Zapata et al., 2013b). Por otra parte, Kalogiannis et al. (2006), al evaluar 30 aislamientos de levaduras de la filósfera de tomate, encontraron que la cepa Y-44 de *R. glutinis* redujo en 90 % la incidencia del moho gris bajo condiciones de invernadero, además de reducir en 50 % el porcentaje de heridas infectadas por *B. cinerea*.

Rhodotorula minuta suprimió eficientemente el desarrollo de la antracnosis del mango causada por *Colletotrichum gloeosporioides* en huertos comerciales durante tres

temporadas de cosecha, cuando fue aplicada a intervalos mensuales. En esta investigación se demostró que la levadura colonizó el filoplano, compitiendo con el patógeno, lo que resultó en una reducción significativa de la infección de las frutas, ya que se redujo la severidad de la antracnosis del fruto a niveles equivalentes o mejores que el fungicida benomil (Patiño-Vera et al., 2005).

Otras levaduras

Otras levaduras epifíticas también han demostrado alta actividad biocontroladora contra *B. cinerea*; tal es el caso de *Pichia membranaefaciens*, que fue eficaz en el control de *B. cinerea* en cultivos de vid (Masih et al., 2001), ya que inhibió al patógeno por coagulación del citoplasma. Asimismo, Saligkarias, Gravanis y Epton (2002) reportaron niveles de control para *B. cinerea* en plantas de tomate cultivadas bajo invernadero del 83 % con las levaduras *Candida guilliermondii*, aislamientos 101 y US 7, y del 62 % con *Candida oleophila* I-182, al ser aplicadas 24 horas antes del patógeno (Saligkarias et al., 2002).

Cryptococcus albidus también mostró actividad biocontroladora contra el moho gris cuando fue aplicado a las hojas y flores de frijol y tomate (Elead, Köhl, & Fokkema, 1994a, 1994b). *Metschnikowia fructicola*, aplicado antes de la cosecha en dos temporadas de cultivo de fresa, en ensayos bajo de invernadero, demostró ser igualmente efectivo que el fungicida Fenhexamid para el control de *B. cinerea* en las etapas previas a la cosecha. Por otra parte, en ensayos de campo, la incidencia de la enfermedad se redujo a niveles comercialmente aceptables en precosecha, además de reducir en un 64-72 % la pudrición de las frutas en poscosecha (Karabulut et al., 2004).

Aplicación de hongos biocontroladores usando entomovectores

El uso de las abejas forrajeras como diseminadores de bioplaguicidas garantiza que el agente biocontrolador llegue a las flores a medida que se abren (Albano et al., 2009; Mommaerts et al., 2010; Shafir et al., 2006). Además, las abejas diseminadoras proporcionan un servicio de polinización adicional, que conduce a un aumento del peso y del rendimiento del fruto (Garibaldi et al., 2015; Klatt et al., 2014; Tuohimetsä,

Hietaranta, Uosukainen, Kukkonen, & Karhu, 2014). El sistema implica varias interacciones entre el vector, el cultivo objetivo y el fitopatógeno (Kevan, Kapongo, Al-mazra'awi, & Shipp, 2008).

Varios hongos biocontroladores han sido utilizados exitosamente para el control del moho gris causado por *B. cinerea* en fresa, cuando son llevados por entomovectores (abejas o abejorros) a las flores, lo que conduce a la prevención de la enfermedad. Esto fue demostrado por Peng et al. (1992) quienes aplicaron mediante entomovectores el hongo *Gliocladium roseum* (sinónimo *Clonostachys rosea*). Otros autores evaluaron las cepas de *T. harzianum*, como la cepa 1295-22 de *T. harzianum* (Kovach, Petzoldt, & Harman, 2000); la cepa T39, aplicada como el producto formulado Tricodex (Bilu, Dag, Elad, & Shafir, 2004), y la cepa T-22 (Albano et al., 2009).

Bacterias en el control biológico de patógenos foliares

En varios trabajos se ha descrito el potencial de uso de diferentes bacterias en el control biológico en la filósfera, usándolas solas o en mezclas; por ejemplo, *Bacillus cereus* (Kokalis-Burelle et al., 1992), *Pseudomonas fluorescens* (Rabindran & Vidhyasekaran, 1996; Umesha, Dharmesh, Shetty, Krishnappa, & Shetty, 1998), *Bacillus subtilis* (Arya & Parashar, 2002), *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Brevibacillus laterosporus* y *Paenibacillus polymyxa* (Alippi, Perelló, Sisterna, Greco, & Cordo, 2000), *Pseudomonas syringae* (Völsch & May, 2001), *Nocardioides thermolilacinus* (Carrer Filho, Romeiro, & Garcia, 2008), *Pantoea agglomerans* (Sharma et al., 2009), *Paenibacillus lentimorbus* (Khan, Mishra, & Nautiyal, 2012), *Pseudomonas aeruginosa* (Maiti, Sen, Paul, & Acharya, 2012), *Streptomyces griseoviridis*, *Streptomyces lydicus* (Cuppels, Higham, & Traquair, 2013), *Streptomyces lavendulae*, *Streptomyces coelicolor* (Abdallah, Haroun, Gomah, El-Naggar, & Badr, 2013), *Serratia nematodiphila* (Khoa, Giàu, & Tuán, 2016; Lee et al., 2017). Sin embargo, pocos de estos trabajos han conducido a desarrollo de productos y a evaluaciones de campo. A continuación, se profundizará en la presentación de algunas bacterias frecuentemente utilizadas.

Bacillus spp.

El género *Bacillus* pertenece a la división Firmicutes, familia Bacillaceae; se caracteriza por sus estructuras de bacilos gram-positivos y son aerobios estrictos o anaerobios facultativos, que en condiciones de estrés forman una endospora central de forma ovalada o cilíndrica, que le permite resistir condiciones desfavorables del ambiente. En general, son móviles, con flagelos peritricos (Turnbull, 1996).

Bacillus spp. se encuentra entre los agentes de control biológico bacterianos más potentes. Aunque se utiliza principalmente para controlar patógenos del suelo, esta bacteria ha sido usada en menor medida para el control de enfermedades foliares (Perelló & Mónaco, 2007). La capacidad de los bacilos para producir esporas los hace extremadamente resistentes a las altas temperaturas, pH desfavorables, radiación ultravioleta, desecación, congelación extrema, escasez de nutrientes y de agua, y desinfectantes químicos (Cano & Borucki, 1995). Estas esporas son producidas por *Bacillus* spp. cuando las condiciones ambientales son desfavorables (Nakano & Zuber, 1998), lo que les permite sobrevivir en la filósfera y controlar fitopatógenos. Las especies más utilizada en el control biológico de fitopatógenos son ubicuas, saprófitas, y se aíslan frecuentemente de suelo, de agua, de aire y de material vegetal en descomposición (Piggot & Hilbert, 2004).

Bacillus subtilis ha sido la bacteria más utilizada. Baker, Stavely y Mock (1985) lograron una reducción del 75% de la roya del frijol con tres aplicaciones semanales de esta bacteria, en comparación con el testigo, encontrando en varios ensayos que *B. subtilis* fue más efectivo que el fungicida Mancozeb. En otros trabajos, se demostró que esta bacteria también controló eficazmente la mancha foliar de la remolacha azucarera, producida por *Cercospora beticola* (Collins & Jacobsen, 2003), y varias enfermedades limitantes del tomate, como el tizón tardío, producido por *Phytophthora infestans*; el tizón temprano, ocasionado por *Alternaria* sp.; el mildew polvoso, producido por *Oidium neolycopersici*, *Erysiphe orontii*, *Leveillula taurica*, y el moho de la hoja, producido por *Fulvia fulva* (Sultan, 2012). En un estudio reciente, se demostró que la cepa UD1022 de *B. subtilis* ejerció control de *Pseudomonas syringae* en *Arabidopsis thaliana* (Kumar & Purohit, 2012).

Por otra parte, Ali y Nadarajah (2014) demostraron que la aplicación en mezcla de *Trichoderma* spp. y de *B. subtilis* controló efectivamente *Magnaporthe grisea* en arroz. Además, *B. subtilis* también ha sido utilizado contra los hongos de la madera (*Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeomoniella chlamydospora*) en vid (Alfonzo, Conigliaro, Torta, Burruano, & Moschetti, 2009), contra la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en chile (Ashwini & Srividya, 2014), contra la roya del fríjol (*Uromyces phaseoli*) (Baker et al., 1985), contra la cercosporiosis de la remolacha azucarera (Collins & Jacobsen, 2003), contra el mildew velloso (*Peronospora*, *Pseudoperonospora*) en hortalizas (Fravel, 1999), contra la mancha negra del aguacate (*Pseudocercospora purpurea*) (Korsten, De Villiers, Wehner, & Kotzé, 1997), contra las bayas momificadas (*Monilinia vaccinii-corymbosi*) en arándano (Scherer, Ngugi, Savelle, & Edwards, 2004) y contra la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano (Serrano, Manker, Brandi, & Cali, 2013).

Otras especies de *Bacillus* también se han utilizado contra diferentes fitopatógenos. *Bacillus amyloliquefaciens* FZB24 se ha evaluado exitosamente contra *Phytophthora*, contra las manchas de las hojas y el mildew polvoso en hortalizas y cucurbitáceas (Bochow, El-Sayed, Junge, Stavropoulou, & Schmiedeknecht, 2001; Borriss, 2011) y contra la antracnosis (*Colletotrichum dematium*) en morera (Hiradate, Yoshida, Sugie, Yada, & Fujii, 2002). *Bacillus mycoides* se ha utilizado contra el moho gris (*Botrytis cinerea*) en fresa (Guetsky et al., 2001) y *B. pumilus* contra *Alternaria*, mildew velloso, mildew polvoso, roya negra y sigatoka negra en banano y en otros cultivos (Serrano et al., 2013).

Streptomyces spp.

Streptomyces es una bacteria gram-positiva, cosmopolita, perteneciente a la familia Streptomycetaceae y es el género más representativo dentro de las Actinobacterias (Kämpfer, 2006), que incluye cerca de 550 especies (National Center for Biotechnology Information [NCBI], 2017). Los miembros de *Streptomyces* son bien conocidos por su habilidad para producir una variedad de compuestos bioactivos con diferentes funciones como antibacteriano (Ramesh & Mathivanan, 2009; Ser et al., 2016), antimicótico (Lam, 2006) y antiviral (Ara,

Bukhari, Aref, Shinwari, & Bakir, 2012). Varias cepas de este género han demostrado potencial para el control biológico de fitopatógenos foliares, especialmente de hongos tales como *Alternaria* (Tahvonen & Avikainen, 1987), *Phoma medicaginis* (Samac, Willert, McBride, & Kinkel, 2003), *Streptomyces scabies* (Hiltunen, Ojanpera, Kortemaa, Richter, Lehtonen, & Valkonen, 2009) y *Colletotrichum gloeosporioides* (Palaniyandi, Yang, Cheng, Meng, & Suh, 2011). En una investigación reciente sobre el control biológico de la piriculariosis, producida por el hongo *Magnaporthe oryzae* (anamorfo *Pyricularia oryzae*), se demostró potencial de diferentes especies de *Streptomyces* como agentes de control biológico altamente efectivos cuando se aplicaron a plántulas infectadas por el patógeno, resultando en hasta 88,3% de reducción de la enfermedad bajo condiciones de invernadero (Law et al., 2017).

Micovirus en el control biológico de patógenos foliares

Los micovirus son un grupo de virus que habitan y se replican en células de hongos filamentosos, levaduras y oomicetos (Ghabrial & Suzuki, 2009). Los micovirus pueden usarse como agentes de control biológico de enfermedades fúngicas en las plantas. Algunos pueden atenuar la patogenicidad de sus hongos hospederos, ejerciendo así control biológico de las enfermedades fúngicas. Un ejemplo clásico lo representa la cepa RNA hipovirus *Cryphonectria* 1 (CHV1), utilizada para controlar el chancro del castaño causado por *Cryphonectria* (syn. *Endothia*) parasítica en Europa (Anagnostakis, 1982); sin embargo, los resultados no fueron muy prometedores. Contrariamente, cuando se utilizó esta cepa en Estados Unidos, se obtuvieron resultados satisfactorios, ya que existen grupos de compatibilidad vegetativa (vcg, por su sigla en inglés) en las poblaciones del patógeno *C. parasitica* en Estados Unidos, que los que existen en Europa, lo que permite la transmisión horizontal del micovirus y, en consecuencia, ocurre el control de la enfermedad (Milgroom & Cortesi, 2004).

Se ha sugerido que la identificación de cepas hipovirulentas de *Botrytis* podría representar una opción para el control de enfermedades causadas por *Botrytis* spp. Los micovirus de ARN que infectan a *Botrytis* se registraron por primera vez en 1995 y hasta ahora se

han registrado varias especies de micovirus ARN de cadena doble o simple (dsRNA o ssRNA por sus siglas en inglés), pertenecientes a Alpha flexiviridae, Gamma flexiviridae, Narnaviridae, Partitiviridae, Totiviridae y a una familia no asignada. Se ha demostrado en *B. cinerea* la cepa BcMV1 que atenúa el crecimiento micelial y la patogenicidad de su hospedero, que además presenta transmisión vertical de hifas a conidios y transmisión horizontal desde aislamientos hipovirulentos a aislamientos virulentos del patógeno (Wu, Zhang, Yang, & Li, 2016). En

consecuencia, existe gran interés en el estudio de los micovirus de *Botrytis* y su utilización como una estrategia viable de control; sin embargo, todavía hay preguntas no resueltas sobre la propagación de los micovirus presentes en los aislamientos donantes y su transmisión a las cepas patogénicas, dado que las poblaciones de *B. cinerea* contiene al menos 66 grupos de compatibilidad vegetativa (Beever & Weeds, 2004), lo que potencialmente representa un gran obstáculo para el uso exitoso de dichos micovirus (Pearson & Bailey, 2013).

Control biológico de virus de plantas

Más de 2.000 virus patógenos han sido reportados a nivel mundial por causar pérdidas económicas considerables, al afectar varias especies de plantas que son utilizadas por el hombre para diferentes objetivos (Hull, 2014). Por ejemplo, el virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*) causa marchitamiento y necrosis, y el virus africano del mosaico de la yuca (*African cassava mosaic virus*) produce mosaicos severos y causan una disminución considerable del rendimiento de la planta (Thresh & Cooter, 2005).

Aunque el control de enfermedades virales mediante métodos químicos o biológicos es reciente y ha tenido poco desarrollo, en el presente capítulo se introducirán los fitopatógenos virales y se mostrarán algunas opciones para su manejo.

Daños en plantas causados por virus y sus características

A nivel mundial, en el 2.002 se calculó que las pérdidas por enfermedades virales eran del 14,6% de la producción de los cultivos, lo que equivale aproximadamente a 220 mil millones de dólares (Agris, 2015).

Los virus de plantas son partículas muy pequeñas que solo se pueden reproducir dentro de las células vivas del hospedero y pueden causar infección. Las partículas virales consisten de material genético (la mayoría con arn y otros con adn) y una proteína de cubierta que protege estos genes que contienen el código genético mínimo para su replicación y protección. El mecanismo de replicación del virus depende completamente de las

células y la maquinaria bioquímica del huésped, lo que hace difícil su control. En las figuras 1.10 y 1.11 se presentan plantas afectadas por diferentes virus.

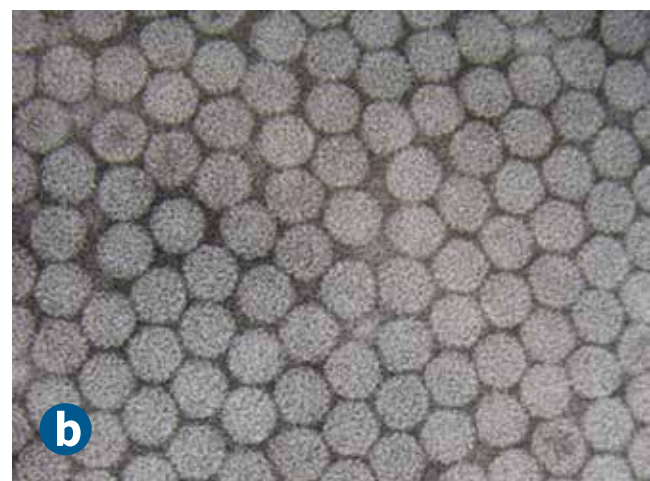


Figura 1.10. Virus del mosaico del pepino (cmv). a. Síntomas típicos en hojas de pepino afectadas; b. Partículas del virus vistas al microscopio electrónico.

Fotos: Sadao Kobayashi y Satoshi T. Ohki



Figura 1.11. Virus del mosaico del tabaco (TMV). a. Síntomas típicos en hojas afectadas en tabaco; b. Síntomas típicos en hojas afectadas en uchuva; c. Partículas del virus vistas al microscopio electrónico.

Fotos: Sadao Kobayashi y Satoshi T. Ohki

Métodos de control de los virus de las plantas

Actualmente, existen varios métodos importantes para el control de virus en plantas, como el control de los vectores por medio del control biológico, el control cultural y el desarrollo y producción de vacunas que contienen virus atenuados o el desarrollo de agentes antivirales. Adicionalmente, también se recomienda el control cultural mediante el uso de semillas sanas y libres de virus, la propagación de cultivos a partir de meristemos certificados como libres de virus o la inserción de genes de resistencia en plantas susceptibles.

Control de vectores

Se conoce que la mayoría de los virus de plantas (alrededor del 76%) son transmitidos por vectores como los artrópodos (áfidos, moscas blancas, trips, ácaros, cochinillas; saltahojas como *Sogatella furcifera*, *Nilaparvata lugens* y *Laodelphax striatellus*; saltapuntas como *Bothrogonia ferruginea* y *Recilia dorsalis*, y escarabajos); nematodos como *Xiphinema americanum* que trasmite el virus de la mancha anular del tabaco (TRSV, por las siglas de *Tobacco ringspot virus*) (McGuire, Kim, & Douthit, 1970), y algunos hongos como *Ospidium virulentus*, que transmite el virus Mirafiori o virus de la vena ancha de la lechuga (*Mirafiori lettuce big-vein virus*) (figura 1.12) (Momono, Mori, Matsuura, Moriwaki, & Morikawa, 2015).

Otros microorganismos transmisores de virus, clasificados como Protista, los representan los plasmodiofóridos; tal es el caso de *Polymyxa* spp., *Plasmodiophora* spp. y *Spongospora* spp., que afectan cereales, hortalizas y papa (Singh, Verma, & Varma, 2008). Dentro del grupo de los vectores, los más importantes son los áfidos, que transmiten el 55% de los virus descritos en plantas (Hogenhout, Ammar, Whitfield, & Redinbaugh, 2008), siendo el control de estos insectos hemípteros uno de los métodos más importantes para manejar diferentes enfermedades virales de gran impacto. Varios microorganismos han demostrado ser eficaces en el control de los insectos vectores de

virus; tal es el caso de los hongos entomopatógenos *Lecanicillium lecanii*, *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces tenuipes* (ver capítulo 6 de este libro sobre “Hongos entomopatógenos en el control biológico de insectos

plaga”), y de bacterias entomopatógenas como *Bacillus thuringiensis* (ver capítulo 5 de este libro sobre “Bacterias entomopatógenas en el control biológico de insectos”).



Fotos: Sadao Kobayashi

Figura 1.12. Síntomas típicos del virus de la vena ancha de la lechuga.

Vacunas o virus atenuados

Una planta que haya sido infectada con un virus en particular no puede infectarse con cepas diferentes del mismo virus o con virus estrechamente relacionados.

Este fenómeno se llama protección cruzada y fue descrito por primera vez para el virus del mosaico del tabaco (TMV) (McKinney, 1929). Posteriormente, Holmes (1934) planteó la posibilidad de desarrollar un virus atenuado de TMV que podría usarse en plantas de tomate, como una vacuna frente a otros virus

similares. Esto significa que una cepa de un virus latente y asintomático o de un virus atenuado que se inocula previamente en una planta puede protegerla de la infección de una cepa virulenta sin causar daño.

Para la elaboración de vacunas con virus atenuados, el material genético debe ser seleccionado a partir de virus mutantes. Uno de los métodos más usados para el logro de mutantes es empleando tallos de plantas, que son infectados de manera sistemática y se almacenan

durante varias semanas a temperaturas desde $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, se induce la mutación por efecto de la radiación de luz ultravioleta o por suspensión en ácido nitroso. La savia de las hojas infectadas con el virus o solo la suspensión del ácido nucleico del virus se mantiene bajo irradiación ultravioleta o en una solución de ácido nitroso. Algunas veces, los virus mutantes atenuados se encuentran de manera latente en plantas hospederas infectadas, como por ejemplo el virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*) (Grant & Costa, 1951) y el virus de los brotes hinchados en cacao (*Cacao swollen-shoot virus*) (Hughes & Ollennu, 1994). Finalmente, los virus mutantes son seleccionados por aislamiento de una lesión y reinoculados en las plantas originales para seleccionar un aislamiento que no muestre ningún síntoma o que presente síntomas muy suaves (tabla 1.2).

Un virus atenuado debe tener las siguientes características: 1) que no produzca ningún síntoma o que los síntomas sean muy suaves y no causen reducción en los rendimientos del cultivo tratado; 2) que sea estable durante un largo período; 3) que no sea transmitido por vectores; 4) que proteja contra una amplia gama de virus y cepas; 5) que no cause lesiones severas en coinfección con otros virus; y 6) que sea fácil de multiplicar y conservar para usos prácticos.

El primer virus atenuado de TMV, denominado L11A, fue seleccionado a partir de cepas avirulentas que fueron obtenidas de tallos de tomate inoculados con el virus e incubados a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 14 días (tabla 1.2). Desde entonces, y por más de 30 años, este virus ha sido usado para proteger de la infección por cepas virulentas al tomate cultivado bajo condiciones de invernadero (Oshima, 1981) (tabla 1.2). Otro ejemplo de virus atenuado es la cepa ZYMV-2002, del virus del mosaico amarillo del calabacín (*Zucchini yellow mosaic virus*), que se encuentra registrado en Japón desde el 2011 como un producto “químico agrícola” liofilizado. Estos virus atenuados han mostrado un comportamiento excelente, teniendo en cuenta que no se ha reportado una reducción en el rendimiento de la producción, en comparación con la reducción causada por la cepa virulenta. Es importante resaltar que obtener virus atenuados es un proceso complicado y su punto débil es que solo son efectivos para prevenir la infección causada por el mismo virus activo o por una cepa muy cercana.

Inicialmente, se creía que el modo de acción de los virus atenuados era la producción por parte de la planta de varias réplicas de proteínas de la cubierta viral, que impiden que, al momento de la infección, el virus virulento pueda quedar sin la cubierta para poder iniciar su replicación (Beachy, 1999). Es importante mencionar que, para que la vacuna pueda ser efectiva en el control de la enfermedad, las proteínas deben ser específicas para cada virus.

Otro modo de acción de los virus atenuados es el silenciamiento del ARN como una reacción de defensa de la planta hospedera. Un ejemplo de este mecanismo es el virus atenuado o cepa L11A de TMV, que tiene en su ARN 11 substituciones de bases, comparado con su cepa virulenta L (Nishiguchi et al., 1985). Este cambio fue causado por una mutación en la proteína de 130k Da, de la cepa L11A, que controla el silenciamiento del ARN y que muestra menos actividad que la virulenta (Kubota, Tsuda, Tamai, & Meshi, 2003).

Otro ejemplo de virus atenuado corresponde a la cepa CM95 del virus del mosaico de pepino (CMV, por las siglas de *Cucumber mosaic virus*), que presenta una mutación en la proteína 2b (Nakazono-Nagaoka, Sato, Kosaka, & Natsuaki, 2004) y actúa como supresor de silenciamiento del ARN (Brigneti et al., 1998; Ding, Li, & Symons, 1995) (tabla 1.2). La cepa ZYMV-2002 del virus del mosaico amarillo del calabacín (*Zucchini yellow mosaic virus*) tiene cuatro sustituciones de aminoácidos en la proteína multifunción HC-Pro (*helper component protein*), cuya función es actuar como un silenciador del supresor y también de la HC-Pro, que es requerida para la transmisión por áfidos. La mutación de la proteína del componente auxiliar HC-Pro evidenció la pérdida de la capacidad de transmisión por áfidos del ZYMV-2002, lo que demostró que no pudo multiplicarse de forma natural (Hokama, Kawano, & Tokashiki, 1993).

Algunos de los virus atenuados tienen ARN satélite, que es una pequeña secuencia de ARN que depende de un virus cooperante o auxiliar (*helper* o máster), necesario para su replicación. A menudo el ARN satélite actúa sobre la multiplicación o sobre los síntomas causados por el virus auxiliar (Roossinck, Sleat, & Palukaitis, 1992). Un ejemplo bien conocido es la cepa atenuada de CMV, que se produjo por unión de su ARN satélite, para controlar la enfermedad causada por este virus (Yoshida, Goto, & Iizuka, 1985).

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

Virus	Cepa/ Aislamiento	Método de obtención	País	Cultivo	Reporte
Virus de la tristeza de los cítricos (<i>Citrus tristeza virus</i>)	HM55a	a	Japón	Cítricos	Sasaki (1974)
	M-16A	b	Japón		Ieki et al. (1997)
	Cepas inactivas	a	Brasil		Costa y Müller (1980)
Virus del mosaico del moteado verde del pepino (<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i>)	SH33b	b, d, e	Japón	Melón	Motoyoshi y Nishiguchi (1988)
Virus del mosaico del pepino (<i>Cucumber mosaic virus</i>)	S51	a, f	China	Tomate	Tien y Wu (1991)
	S52	a, f	China	Tomate	Tien y Wu (1991)
	KO3	a, f	Japón	Tomate	Sayama et al. (1993)
	CM95	a	Japón	Pepino, etc.	Kosaka y Fukunishi (1997)
Virus de mosaico de brotes hinchados de cacao (<i>Cocoa swollen shoot mosaic virus</i>)	Cepas inactivas	a	Ghana	Cacao	Hughes y Ollennu (1994)
Virus del moteado atenuado del pimiento (<i>Pepper mild mottle virus</i>)	Pa18	b	Japón	Pimienta	Goto et al. (1984)
	C-1421	b	Japón		Nagai (1987)
Virus de la mancha anular de la papaya (<i>Papaya ringspot virus</i>)	HA5-1	d	EE. UU., Taiwán	Papaya	Yeh y Gonsalves (1984)
Virus del mosaico de la soja (<i>Soybean mosaic virus</i>)	Ala15-M2	c	Japón	Soya	Kosaka y Fukunishi (1993)
Virus del mosaico del tabaco (<i>Tobacco mosaic virus</i>)	M	b	EE. UU.	Tabaco	Holmes (1934)

(Continúa)

(Continuación tabla 1.2)

Virus	Cepa/ Aislamiento	Método de obtención	País	Cultivo	Reporte
Virus del mosaico del tomate (<i>Tomato mosaic virus</i>)	L11A	b	Japón	Tomate	Goto y Nemoto (1971); Oshima (1981)
	MII-16	d	Holanda, Reino Unido, etc.		Rast (1975)
	K	d	China		Yang et al. (2002)
Virus del mosaico amarillo del calabacín (<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>)	ZY95	c, d	Japón	Pepino	Kosaka y Fukunishi (1997)

*Método: a. Selección natural; b. Alta temperatura; c. Baja temperatura; d. Ácido Nitroso; e. Radiación ultravioleta; f. RNA satélite.
Fuente: Adaptada de Nishiguchi & Kobayashi (2011)

Agentes antivirales

Allard (1915) reportó el primer inhibidor de una infección causada por fitovirus, a partir de una proteína antiviral extraída de la planta conocida como hierba carmín (*Phytolacca americana*). Hasta el momento, se han examinado muchos materiales vegetales para evaluar el control de los virus de las plantas. Entre los antivirales de origen vegetal, la proteína antiviral PAP, aislada de *P. americana*, es bien conocida (Duggar & Armstrong, 1925). Otros antivirales de proteínas aisladas son la glicoproteína Dianthina del clavel (*Dianthus caryophyllus*) (Stirpe, Williams, Onyon, Legg, & Stevens, 1981), la proteína antiviral MAP de *Mirabilis jalapa* (Kubo, Ikeda, Imaizumi, Takanami, & Mikami, 1990), IRIP de *Iris hollandica* (Van Damme et al., 1997), Trichosanthin de *Trichosanthes kirilowii* (Lam et al., 1996) y Figaren de *Cucumis figarei* (Fujiwara, Kanamori, Ohki, & Osaki, 2001).

Estos inhibidores son proteínas inactivadoras de ribosomas (PIR), que muestran actividad antiviral frente a virus de plantas y animales (Barbieri, Battelli, & Stirpe, 1993). Adicionalmente, estas proteínas o glicoproteínas vegetales parecen bloquear

específicamente los sitios de infección en las plantas y no inhiben la transmisión por áfidos.

Además de las PIR, se ha reportado que el filtrado del caldo de cultivo de crecimiento de algunos hongos causa reducción de la infección viral en plantas. Un ejemplo de esta actividad es la demostrada para el hongo patógeno *Trichothecium roseum*, que causa putrefacción rosada en varias frutas y hortalizas, pero se caracteriza porque produce un polisacárido llamado T-poli, que induce resistencia sistémica en las plantas, contrarrestando la infección viral (Gupta, Chandra, Verma, & Verma, 1974).

Otros inductores de resistencia sistémica han sido aislados a partir de *Fomes fomentarius* (BAS, polisacárido) (Aoki et al., 1993), *Phytophthora megasperma* (glicoproteína) (Parker, Schulte, Hahlbrock, & Scheel, 1991), *Boerhavia diffusa* (glicoproteína) (Verma & Awasthi, 1980), *Clerodendrum aculeatum* (proteína) (Verma, 1994), *Cyamopsis tetragonoloba* (proteína) (Khan & Verma, 1990), *Bougainvillea spectabilis* (proteína) (Verma & Dwivedi, 1984). El modo de acción de estos no está claro, pero se sabe que no actúan directamente sobre el virus y que el agente inhibidor se sintetiza en plantas inoculadas con el inductor y no

en plantas inoculadas con virus. Esto fue demostrado por Verma y Dwivedi (1984), quienes reportaron que el agente antiviral fue producido en las hojas basales de plantas tratadas con el extracto de raíz de *Boerhaavia diffusa* (sin inoculación de virus). En el mismo trabajo (Verma & Dwivedi, 1984), la proteína inducida por *B. diffusa* fue eficaz no solo en plantas de su misma especie, sino también en otras especies, en las que se produjo inducción de resistencia sistémica causando reducción de la infección viral.

Un ejemplo del uso de este tipo de control es el adoptado por los agricultores japoneses, quienes cultivan Shiitake (*Lentinula edodes*) en restos de caña de azúcar y aplican Lentemin®, que es un extracto de medio de cultivo que está registrado y se comercializa para evitar la infección por virus en cultivos de tomate, pimiento verde, pepino, melón y orquídeas (Kobayashi, Hiramatsu, & Akatsuka, 1987).

Todos los agentes mencionados anteriormente actúan como inhibidores de la infección viral, pero no son inhibidores de su multiplicación. En contraste, el antibiótico Blastocidin S, que se usaba como fungicida en arroz, mostró actividad antiviral (Hirai et al., 1966) al inhibir la síntesis de proteínas, y al parecer también la síntesis viral de la polimerasa.

No obstante, aunque los agentes antivirales tienen la ventaja de poder controlar varios virus al tiempo, están muy lejos de poder ser implementados dentro de estrategias de manejo, puesto que son muy pocos los intentos de evaluarlos bajo condiciones de campo.

Herramientas biotecnológicas para el control de fitovirus

El ácido nucleico viral tiene al menos tres genes: uno para codificar la proteína de la cubierta, otro para la enzima replicasa y otro para la proteína de movimiento. Estos tres pueden ser los objetivos para el desarrollo de estrategias de control biotecnológico. El TMV es el modelo pionero y se ha utilizado para la primera prueba real de la resistencia mediada por la proteína de la cubierta (Abel et al., 1986), la resistencia mediada por la replicasa (Golemboski, Lomonossoff, & Zaitlin, 1990) y la resistencia mediada por la proteína de movimiento (Deom et al., 1990).

Una vez el virus invade una célula de la planta, la cápside se desarma y su ácido nucleico penetra en el núcleo para la traducción y su posterior replicación. Con base en esto, se ha demostrado que cuando a una planta, antes de que sea infectada por el virus, se le transfiere un gen que codifica para alguna proteína de cápside y esta es replicada y sintetizada, puede inhibir tanto el proceso de replicación del virus como el recubrimiento del virus invasor. En la actualidad, se ha demostrado que este método es eficiente en la prevención o reducción de la infección y la enfermedad causada por virus idénticos y estrechamente relacionados. Adicionalmente, también se ha reportado protección mediada por proteínas de cubierta para TMV (Sanders et al., 1992), CMV (Shigetou, Kaishu, Gonsalves, Gonsalves, & Slightom, 1991), el virus X de la papa (PVX, por las siglas de *Potato virus X*) (Hemenway, Fang, Kaniewski, Chua, & Tumer, 1988), el virus Y de la papa (PVY, por las siglas de *Potato virus Y*) (Perlak, Kaniewski, Lawson, Vincent, & Feldman, 1994) y el virus de la mancha anular de la papaya (PRSV, por las siglas de *Papaya ringspot virus*) (Kaniewski, Lawson, & Thomas, 1993).

Uno de los ejemplos exitosos de este mecanismo de acción es la resistencia de las plantas de papaya a PRSV, que causó graves pérdidas en los principales países productores. La planta de papaya transgénica llamada Rainbow o línea 51-5, a la que se le transfirió el gen que codifica una proteína de la cubierta viral de este virus cepa HA5-1, demostró ser resistente frente a la infección del virus y se empezó a comercializar desde 1998 en Hawaii (Fitch, Manshardt, Gonsalves, Slightom, & Sanford, 1992). Es importante aclarar que, aunque las plantas Rainbow 51-1 contienen un gen que codifica una proteína viral, la resistencia no se debe a la inhibición del revestimiento del virus como tal, sino que se atribuye al silenciamiento del gen (Ruanjan, Kertbundit, & Juříček, 2007).

También se reportó la resistencia mediada por la replicasa, cuyo gen se introdujo en plantas empleando biotecnología, frente a PVX (Audy, Palukaitis, Slack, & Zaitlin, 1994), al virus del mosaico de la alfalfa (AMV, por las siglas de *Alfalfa mosaic virus*) (Brederode, Taschner, Posthumus, & Bol, 1995), al CMV (Hellwald & Palukaitis, 1995), al virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV, por las siglas de *Tomato yellow leaf curl virus*) (Noris et al., 1996) y a TMV. Las plantas transgénicas resistentes a TMV contienen una

secuencia que codifica un fragmento de 54 kDa de la enzima replicasa, sin que la proteína sea detectada posteriormente en las células (Golemboski et al., 1990). Por eso, la resistencia mediada por ARN viral puede considerarse en plantas como un ejemplo de silenciamiento de genes post-transcripcional (Prins et al., 2008).

La proteína de movimiento codificada por el virus ayuda a las partículas virales o al ácido nucleico viral a moverse de una célula a las células vecinas, por vía plasmodesmos. Las plantas transgénicas en las que se altera la acumulación de las proteínas de movimiento evidenciaron resistencia frente a TMV (Deom et al., 1990). Posteriormente, Cooper, Lapidot, Heick, Dodds y Beach (1995) describieron que las plantas de tabaco transgénicas, con este mecanismo, no solo mostraron un alto nivel de resistencia a TMV (Tobamovirus), sino también frente a virus no relacionados como el virus del cascabeleo del tabaco (TRV, por las siglas de *Tobacco rattle virus*) (Tobravirus), el virus de la estría clorótica del maní (PCISV, por las siglas de *Peanut chlorotic streak virus*), (Caulimovirus), el virus de la mancha anillada del tabaco (TRSV, por las siglas de *Tobacco ringspot virus*) (Nepovirus), el virus del mosaico de la alfalfa AMV (Alfamovirus) y el CMV (Cucumovirus).

Otros ejemplos de plantas transgénicas que han sido comercializadas corresponden a las que evidencian resistencia frente a ZYMV y al virus del mosaico de la sandía (WMV, por las siglas de *Watermelon mosaic virus*) (Fuchs & Gonsalves, 1995), así como plantas de papa que han demostrado resistencia frente al

virus del enrollamiento de la hoja de papa (PLRV, por las siglas de *Potato leafroll virus*) y a PVY, entre otras (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications [ISAAA], 2017).

Como se ha ilustrado en este capítulo, la ingeniería genética es un método de control muy eficaz para contrarrestar las infecciones virales en una amplia gama de cultivos, ya que consiste en una tecnología rápida y exacta para obtener plantas resistentes a los virus. Es importante resaltar que los cultivos transgénicos o los virus transformados están sujetos a normas de bioseguridad, por los posibles impactos negativos que pueden tener sobre el medio ambiente y la salud humana, sin que se haya reportado algún tipo de problema.

A pesar de las grandes ventajas del uso de plantas transgénicas resistentes a virus, su uso es muy limitado. Se estima que el área global de cultivos genéticamente modificados por país en el 2016 fue así: en EE. UU., 72,9 millones de ha (39,4%); en Brasil, 49,1 millones de ha (26,5%); en Argentina, 23,8 millones de ha (12,9%); en Canadá, 11,6 millones de ha (6,2%), y en India, 10,8 millones de ha (5,8%), entre otros; el área cultivada dentro de estos cinco países es de 168,2 millones de ha (90,9%) (ISAAA, 2017). Este dato indica que, incluso en los países donde esta tecnología es adoptada, su uso sigue siendo limitado, principalmente por la baja aceptación pública; por esta razón, se debe continuar realizando estudios, con el fin de demostrar que las plantas transgénicas son seguras y aún hay un largo camino por explorar.

Modos de acción de los biocontroladores de patógenos foliares

La actividad biocontroladora de fitopatógenos foliares depende de diversos mecanismos de acción, como la competencia por espacio y por nutrientes, el hiperparasitismo, la lisis, la antibiosis, la inducción de resistencia en la planta hospedera, la restricción de los factores de patogenicidad, la reducción de la capacidad saprofítica del patógeno —cuando esta existe— y la diseminación de sus esporas. En general, los patógenos necrótrofos como *B. cinerea* dependen de nutrientes exógenos y son susceptibles a la competencia de agentes microbianos o de sus secreciones inhibitorias,

mientras que los patógenos biotróficos, como los que causan el mildew, son independientes de nutrientes exógenos durante la germinación y la penetración, y pueden establecer una infección en una superficie vegetal agotada. No obstante, en la superficie de la planta, los conidios o los tubos germinativos de los biótrosos son susceptibles a antibióticos y enzimas líticas producidas por microorganismos (Elad, 1996). A continuación, se describirán los principales mecanismos involucrados en el control biológico de patógenos foliares.

Competencia

Desde la perspectiva de un microorganismo, la superficie de las plantas es un ambiente hostil, limitado en cuanto a la disponibilidad de nutrientes (Andrews, 1992). De acuerdo con esto, para que un microorganismo pueda colonizarla debe competir por los nutrientes y por el lugar donde estos se encuentran (Pal & Gardener, 2006).

En este sentido, la competencia como forma de supervivencia es uno de los modos de inhibición de fitopatógenos más importante y es definido como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, ya sea este un nutriente o un nicho específico para su crecimiento (Hjeljord & Tronsmo, 1998). Por lo tanto, características como la adaptación a diferentes condiciones ecofisiológicas, como la temperatura, la humedad y el pH presente en la filósfera, así como la velocidad de crecimiento y desarrollo del biocontrolador, pueden favorecer la colonización de un sustrato por una determinada comunidad microbiana en detrimento de otra (Hjeljord & Tronsmo, 1998; Muccilli & Restuccia, 2015).

La competencia por nutrientes, sean estas fuentes de nitrógeno, carbono o cualquier microelemento, es un modo de acción asociado particularmente a las bacterias y a las levaduras (aunque no exclusivas de estas), debido a la relación superficie/volumen que estos microorganismos presentan, así como su crecimiento exponencial, cualidad que les permite consumir con mayor rapidez los nutrientes disponibles, en comparación con los tubos germinativos de los conidios de los hongos fitopatógenos. Las levaduras constituyen un grupo de microorganismos caracterizados por su capacidad de crecer y sobrevivir en condiciones adversas y estresantes, y de colonizar una amplia variedad de ambientes, siendo uno de los grupos de microorganismos dominantes en la filósfera (Droby, Wisniewski, Macarisin, & Wilson, 2009; Janisiewicz, Tworkoski, & Sharer, 2000; Muccilli & Restuccia, 2015).

En el mismo sentido, la competencia por sustrato, ligada a la capacidad de asimilar diferentes fuentes de nutrientes, es considerada como un atributo de adaptación ecológica, sumado a una alta velocidad de crecimiento, abundante producción de cuerpos

fructíferos o esporulación; asimismo, un metabolismo eficiente, que le permita mediante la producción de una variedad de metabolitos y enzimas colonizar diferentes sustratos, es un eficiente mecanismo utilizado por varios biocontroladores.

Patógenos como *Botrytis cinerea* son particularmente susceptibles a la ausencia de nutrientes, ya que este factor limita la germinación de los conidios, la formación del tubo germinal y los procesos posteriores de infección (Elad, 1996; Filonow, Vishniac, Anderson, & Janisiewicz, 1996). En este sentido, la aplicación preventiva de agentes de control biológico como las levaduras puede reducir la incidencia del patógeno y, por supuesto, las pérdidas que este provoque.

Este modo de acción se ha demostrado para muchas levaduras, entre ellas *Sporobolomyces roseus* contra *B. cinerea*, cuando es inoculada simultáneamente con el patógeno y antes de que este colonice heridas de manzanas, obteniendo una incidencia del 25 %, comparada con el 99 % de incidencia del tratamiento *B. cinerea* y con el 92 % alcanzado con benomil (Filonow et al., 1996).

Igualmente, las levaduras en las heridas de las frutas crean un ambiente pobre en oxígeno y en hierro, ya que producen sideróforos para capturar el hierro, afectando la germinación de los conidios de los patógenos. *Rhodotorula glutinis* produce ácido rodotorúlico, que es un sideróforo hidroxamato esencial en el control de *Penicillium expansum* en manzanas (Calvente, Benuzzi, & de Tosetti, 1999), en tanto que *Metschnikowia pulcherrima* y *Metschnikowia fructicola* producen un pigmento rojo denominado "pulquerrimina", involucrado en el control de *B. cinerea*, *Alternaria alternata* y *P. expansum* en manzanas (Saravanakumar, Spadaro, Garibaldi, & Gullino, 2009).

Por otra parte, patógenos biótrofos como los causantes de los mildes o las royas, que no dependen de nutrientes exógenos para la germinación de los conidios y para la penetración, también pueden establecerse sobre la superficie de la planta, aunque los nutrientes se hayan agotado. Sin embargo, los conidios o tubos germinales están expuestos a los antibióticos y a las enzimas líticas producidas por diferentes microorganismos (principalmente bacterias como *Bacillus* spp., y *Pseudomonas* spp.), que pueden inhibir la germinación y lizar los tubos germinativos (Elad & Freeman, 2002).

Por otro lado, el hongo *Trichoderma* spp. está biológicamente adaptado para realizar una colonización agresiva de los sustratos; además, tolera condiciones adversas para sobrevivir mediante crecimiento activo o formando clamidosporas que le sirven como estructuras de resistencia. Su alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación y la amplia variedad de enzimas que produce hacen que sea un muy eficiente saprófito y un excelente agente de control biológico (Harman, 2000; Sawant, 2014).

En el control de fitopatógenos, la competencia por nutrientes ha presentado resultados importantes, particularmente contra hongos necrotróficos. De acuerdo con Kessel (1999, citado por Lindow et al., 2004), el control de estos patógenos puede obtenerse durante su fase saprofítica, cuando este es susceptible a la ausencia de nutrientes, limitando así su desarrollo y la producción de las enzimas necesarias para la invasión de los tejidos (Lindow et al., 2004).

Micoparasitismo y lisis

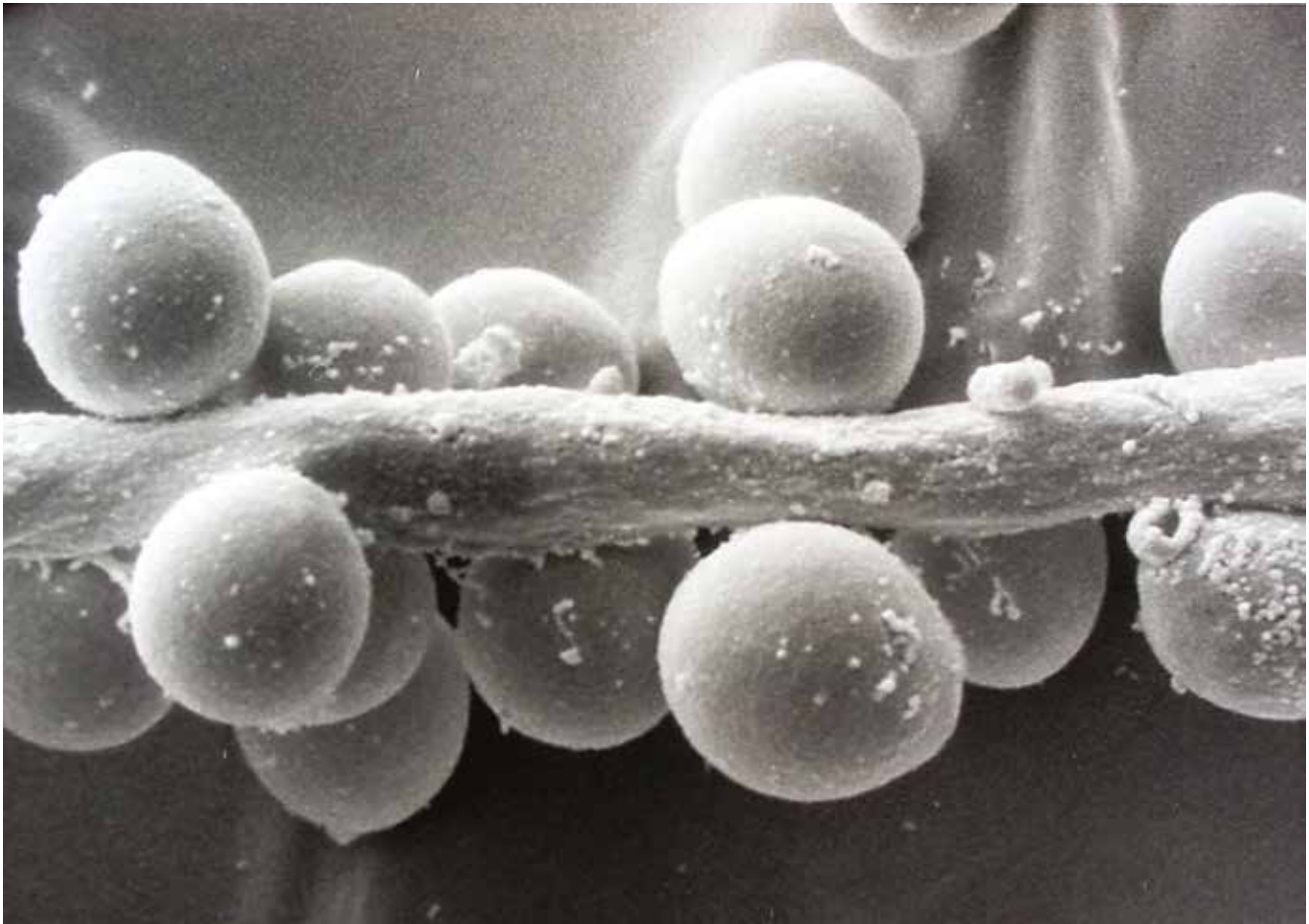
El ataque directo por el antagonista hacia un fitopatógeno específico, sea necrótrofo o biótrofo, es uno de los ejemplos más usados para describir el micoparasitismo realizado por especies del género *Trichoderma*, uno de los microorganismos más característicos por presentar este modo de acción; en general, esto ocurre concomitantemente con la producción de metabolitos secundarios tóxicos y de enzimas como quitinasas, celulasas y β 1-3 glucanasas, que degradan la pared celular de diversos fitopatógenos (Lindow et al., 2004; Stefanova, Leiva, Larrinaga, & Coronado, 1999).

Varias levaduras también ejercen un micoparasitismo (figura 1.13), como *Pseudozyma aphidis* en su interacción con *Podosphaera xanthii*, que además de antibiosis y resistencia inducida parasita al patógeno (Gafni et al., 2015).



Fotos: Yigal Elad

Figura 1.13. Conidios del mildew polvoso colapsados por una levadura. Imagen al microscopio electrónico de barrido.



Fotos: Yigal Elad

Figura 1.14. Adhesión de conidios de *Trichoderma harzianum* T39 sobre hifa de *Botrytis cinerea*. Imagen al microscopio electrónico de barrido.

Una gran variedad de hongos exhibe el micoparasitismo como mecanismo de consecución de nutrientes, siendo algunos de ellos *Ampelomyces*, *Trichoderma*, *Gliocladium* y *Pythium* spp., que han sido empleados como principio activo de diferentes bioplaguicidas (Chet, Benhamou, & Haran, 1998; Elad, 1995; Szentiványi & Kiss, 2003).

En *Trichoderma* spp., el proceso de parasitismo exhibe un crecimiento quimitrófico hacia el fitopatógeno blanco. Posteriormente, se presenta un período de reconocimiento molecular entre este y el huésped, siendo el evento que precede al proceso de antagonismo propiamente dicho, que es mediado por la interacción entre lectinas y carbohidratos (Chet et al., 1998); luego, se produce la adhesión (figura 1.14) y el enrollamiento sobre el micelio del huésped, mediante la formación de apresorios y la producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas que degradan las paredes

celulares del huésped, facilitando la penetración de las hifas de *Trichoderma* spp., para luego absorber los nutrientes del interior del hongo parasitado (Bélanger, Dufour, Caron, & Benhamou, 1995; Elad & Kapat, 1999; Harman, 2000; Howell, 2003).

Entre los micoparásitos más conocidos por atacar el micelio de *B. cinerea*, se encuentran *Trichoderma*, *Gliocladium* y *Pythium* spp. (Elad, 1996). El parasitismo de los esclerocios de *B. cinerea* también se ha descrito (Köhl & Schlösser, 1989); además, se ha demostrado que varias enzimas están implicadas en el micoparasitismo de este patógeno, incluyendo las que degradan la pared celular, como proteinasas, mananasas, laminarinasas y quitinasas (Labudova & Gogorova, 1988). Se han logrado nuevos avances en el entendimiento de las interacciones Botrytis-biocontrolador, con el análisis de patrones de proteínas secretadas por *T. harzianum* ETS 323 en condiciones de laboratorio (Yang, Yang, Peng, Lo, & Liu, 2009).

Un L-aminoácido oxidasa (LAAO) y dos endoquitinasas del biocontrolador se indujeron en el medio de cultivo que contenía micelio inactivo de *B. cinerea*, como la única fuente de carbono. Las enzimas β -1,3-glucanasas, β -1,6-glucanasas, quitinasas, proteasas y xilanasas fueron significativamente mayores en los medios que contenían *B. cinerea* inactivo que, en otros medios, lo que sugiere que la pared celular de *B. cinerea* es el objetivo principal del biocontrolador (Yang et al., 2009).

El micoparasitismo ha sido demostrado en diferentes accesiones de *Trichoderma* spp., que hacen parte del Banco de Germoplasma de Microorganismos con Interés en Control Biológico de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica). Estas cepas han sido aisladas de variedad de sustratos y de lugares de Colombia (Smith et al., 2013). Este modo de acción también lo presenta la cepa colombiana *Trichoderma koningiopsis* cepa Th003, principio activo del bioplaguicida Tricotec®, desarrollado por la misma entidad, que parasita eficientemente el micelio y los esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* en sistemas de producción de hortalizas (Moreno et al., 2010b).

Las enzimas producidas por el biocontrolador pueden jugar no solamente efecto directo durante el proceso de micoparasitismo, sino inhibición de la actividad patogénica. En este sentido, Elad y Kapat (1999) observaron que las proteasas producidas por *T. harzianum* T39 en las hojas reducían la germinación de los conidios y la actividad de las enzimas de *B. cinerea*, lo que detuvo el desarrollo de la enfermedad. Asimismo, se ha encontrado que varias especies de la bacteria *Lysobacter* son productoras de una gran variedad de enzimas líticas como quitinasas, β 1-3 glucanasa, lipasas y proteasas, que inhiben el crecimiento de patógenos como *B. cinerea* y *Phytophthora capsici*, ya sea por cambios estructurales producidos en la pared celular de los hongos o por la inhibición de la actividad de sus enzimas (Gómez-Expósito, Postma, Raaijmakers, & De Bruijn, 2015; Ko, Jin, Krishnan, Lee, & Kim, 2009).

Este efecto también se ha observado con otros metabolitos como los sideróforos, particularmente con la enteroquelina producida por la enterobacteria *Rahnella aquatilis*, que reduce la actividad de las

enzimas poligalacturonasa y lacasa producidas por *B. cinerea* (Sansone et al., 2011).

En contraste con la competencia por espacio y nutrientes, el parasitismo ligado a la lisis es el modo de acción eficiente en el control de fitopatógenos obligados como mildos o royas. Hongos como *Ampelomyces quisqualis* ha mostrado alta eficiencia en el control de mildo polvoso en vid, manzanos y rosales; mediada por la producción y acción de exo- β -1,3-glucanasa, las hifas penetran tanto estructuras asexuales como micelio y conidios, así como estructuras sexuales como cleistotecios. Una vez se desarrolla, produce sus picnidios, lo que le permite parasitar las estructuras de resistencia o hibernantes del patógeno, ampliando el potencial de control (Kiss, 2003; Punja & Utkhede, 2003; Szentiványi & Kiss, 2003).

El fenómeno de micoparasitismo sobre el mildo polvoso y algunas royas también ha sido demostrado para el hongo entomopatógeno *Lecanicillium lecanii* que, aparte de controlar insectos plaga como áfidos, también ha sido eficiente en el control de fitopatógenos (Kim, Goettel, & Gillespie, 2007). Al realizar aplicaciones de Mycotal®, cuyo principio activo es *L. lecanii*, parasitó el micelio de *Sphaerotheca fusca* en melón bajo invernadero, siendo más eficiente en el control cuando se aplicó en etapas tempranas de la infección del patógeno, comparado con otros micoparásitos como *Acremonium alternatum* y *A. quisqualis* (Jackson, Skillman, & Vandermeer, 2012; Romero et al., 2007b; Romero, Rivera, Cazorla, De Vicente, & Pérez-García, 2003). Jackson et al. (2012) también observaron la capacidad de parasitismo de *L. lecanii* contra la roya del café *Hemileia vastatrix*, al realizar aplicaciones para el control de la escama verde de café *Coccus viridis*.

Antibiosis

La antibiosis se define como la interacción que involucra un compuesto de bajo peso molecular o un antibiótico producido por un microorganismo que tiene un efecto negativo sobre otro (Lo, 1998), mecanismo de supresión atribuido particularmente a ciertas especies de bacterias y hongos. La capacidad de producir diferentes antibióticos probablemente

está involucrada en la supresión de los competidores, algunos de los cuales son patógenos de las plantas. Este modo de acción es ejercido por un amplio número de bacterias y hongos biocontroladores para el control de patógenos necrótrofos o biótrosos. Un ejemplo de este es la levadura *Pseudozyma flocculosa*, habitante común de la superficie de hojas y frutas, que produce y libera metabolitos con actividad antifúngica eficaz en el control de diferentes fitopatógenos (Lindow et al., 2004).

Diferentes especies de los géneros *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. y *Streptomyces* spp. también se han caracterizado por producir una gran variedad de antibióticos, siendo además los dos primeros los más estudiados y utilizados como agentes de control biológico. En cuanto al género *Bacillus*, especies como *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mycooides*, *B. pumilus* y *B. subtilis* son conocidas por ser muy eficientes en la producción de varios antibióticos; por ejemplo, aproximadamente el 5 % del genoma de *B. subtilis* está dedicado para la síntesis de antibióticos, en tanto que para *B. amyloliquefaciens* es el 8 %. Esto les confiere capacidad para producir más de una veintena de compuestos antimicrobianos estructuralmente diferentes (Chen et al., 2009; Rückert et al., 2011; Stein, 2005).

Los antibióticos producidos por diferentes especies de *Bacillus* se encuentran agrupados en tres familias: las surfactinas, las iturinas y las fengicinas, que de acuerdo con las características genéticas de cada cepa varían en su estructura (Abriouel, Franz, Omar, & Gálvez, 2011; Arguelles-Arias et al., 2009; Stein, 2005). Se han demostrado los efectos de metabolitos de *Bacillus* spp. en el control de patógenos foliares. Ali et al. (2016) encontraron que, al realizar aplicaciones foliares tanto preventivas como posteriores a la inoculación del patógeno de filtrados de cultivo de *B. subtilis* en plantas de flor de Pascua, dieffenbachia y tomate, se logró reducir entre 68 y 81 % el tamaño y número de lesiones causadas por *Alternaria alternata*. Asimismo, se demostró la contribución de las iturinas y de las fengicinas en el antagonismo de *B. subtilis* hacia *Podosphaera fusca*, que infecta las hojas de melón; en este caso, se obtuvo un efecto inhibitor sobre la germinación de los conidios del patógeno (Romero et al., 2007a). En otro trabajo, se demostró el efecto inhibitor de las iturinas de *Bacillus amyloliquefaciens*

sobre *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal de la antracnosis en mora (Hiradate et al., 2002).

El género *Pseudomonas* incluye diferentes especies que colonizan el suelo y la superficie de las plantas. Especies como *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. aeruginosa* y *P. aureofaciens* producen diferentes antibióticos que pueden ser agrupados en varias clases: 1) floroglucinoles (2,4-diacetilfloroglucinol), 2) fenazinas, 3) pirrolnitrina (a partir de este antibiótico se desarrolló el fungicida fludioxonil), 4) pioluteorina y 5) cianuro de hidrógeno (Meena, 2014). La actividad de estos antibióticos está relacionada con daños en la membrana celular, que en los conidios causa su permeabilización, inhibiendo así su germinación, y en el micelio provoca su disrupción y vacuolización (Chitarra et al., 2003; Etchegaray et al., 2008). Aunque no son muchos los ejemplos de control de patógenos foliares con *Pseudomonas*, atribuidos a antibióticos, Défago et al. (1990) demostraron que el cianuro secretado por la cepa CHAO de *P. fluorescens* desempeñaba un papel importante en el control de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*; posteriormente, se le atribuyó al 2,4-diacetilfloroglucinol efecto en el control de este patógeno (Keel et al., 1992). Por otra parte, Sreenivasulu y Aparna (2001) le atribuyen el control de *Ganoderma lucidum* en coco a un metabolito volátil también producido por *P. fluorescens*.

Algunos hongos, particularmente especies de *Trichoderma*, producen diferentes metabolitos con propiedades antibióticas, que pueden ser de naturaleza volátil y no volátil. Aunque en un principio se consideró que la acción inhibitoria sobre otros hongos se debía a compuestos no volátiles, Dennis y Webster (1971) identificaron que la actividad de control se debía a compuestos volátiles, notando que las accesiones más eficientes producían un fuerte olor a coco, relacionado quizás con la actividad antagonista.

Entre los metabolitos volátiles, el 6 pentil- α -pirona (6PAP) es el más conocido y estudiado, producido por especies como *T. atroviride*, *T. koningii*, *T. viride* y *T. harzianum*; este metabolito es un poliquétido con un dulce aroma a coco y cuya toxicidad se relaciona con su capacidad hidrofóbica, que le permite adsorberse dentro de las membranas celulares, formando una capa hidrorrepelente sobre la pared celular, que impide la absorción de agua por la célula del hongo (Jeleń,

Błaszczuk, Chełkowski, Rogowicz, & Strakowska, 2014; Scarselletti & Faull, 1994; Sivasithamparam & Ghisalberti, 1998). La actividad de los metabolitos volátiles se relaciona con un efecto esencialmente fungistático, ya que debilita al patógeno, haciéndolo aún más sensible a los antibióticos no volátiles, lo que se conoce como un “hiperparasitismo” de origen enzimático (Bélanger et al., 1995).

En cuanto a los antibióticos no volátiles, diferentes especies de *Trichoderma* se han caracterizado por producir antibióticos como alameticina, dermadina, furanona, gliotoxina, pacibasina, suzukacilina, trichodermina, trichotecenos, trichorzianina y viridina, que causan a nivel celular la vacuolización, granulación, coagulación, desintegración y lisis (Howell, 2003; Mukherjee, Horwitz, & Kenerley, 2012; Sivasithamparam & Ghisalberti, 1998). Aunque son pocas las demostraciones del efecto biocontrolador de los metabolitos volátiles de *Trichoderma* spp. en condiciones de campo, se han desarrollado algunos trabajos utilizando aislamientos de *T. harzianum*, *T. virens*, *T. viride*, *T. reesei* y *T. saturnisporum*, cuyos metabolitos inhibieron el desarrollo de *Colletotrichum capsici* en pimiento (Ajith & Lakshmidhevi, 2010).

En otro estudio, se demostró que 34 aislamientos de *Trichoderma* spp. produjeron metabolitos volátiles, tóxicos para *C. gloeosporioides* en vid (Sawant, Rajguru, Salunkhe, & Wadkar, 2012).

Por otra parte, aun cuando la producción de antibióticos no sea una cualidad atribuida a las levaduras, *Pseudozyma flocculosa* y *Pseudozyma rugulosa* son conocidas por su actividad de control sobre mildew polvoso mediante la producción de antibióticos, que son una mezcla de ácidos grasos, particularmente los ácidos 9-heptadecenoico, 6-metil-9-heptadecenoico y 4-metil-7,11-heptadecadienoico. Estos tienen una acción citotóxica, ya que los ácidos grasos antifúngicos se insertan naturalmente en la membrana lipídica de las membranas fúngicas, produciendo una interrupción física (o mecánica) que induce una elevada volatilidad. Este efecto es producido por la alta libertad de movimiento de los ácidos grasos, que implica la rotación de la molécula en la membrana fúngica y el desplazamiento de los componentes de la membrana, debido al doblez o curvatura fija en estos ácidos grasos insaturados, lo que causa una elevada

humedad de la membrana. Los esteroides tienden a neutralizar esta elevación en la fluidez de la membrana inducida por el estrés, pero los hongos que tienen un contenido bajo en esteroides, como los causantes del mildew polvoso, no son capaces de hacer frente a una elevación excesiva de la fluidez de la membrana. Esto provoca una desorganización generalizada de la membrana, que conduce a la liberación de componentes intracelulares, trastorno citoplasmático y, finalmente, a la desintegración celular (Avis & Bélanger, 2002).

En relación con la inhibición de *Botrytis* spp. por compuestos antimicrobianos, se ha demostrado que *Penicillium chrysogenum* produce compuestos que reducen la germinación conidial de *Botrytis fabae*, reduciendo las lesiones producidas por el patógeno en las vainas de frijol (Jackson et al., 1997). Por otra parte, los biocontroladores *T. harzianum* y *Gliocladium virens* producen los antibióticos peptaibol y gliotoxina, respectivamente, que inhibieron la germinación de los conidios de *B. cinerea* (Schirmböck et al., 1994). *Bacillus brevis* secreta gramicidina S, que es un potente inhibidor de *B. cinerea* (Edwards & Seddon, 1992). Otras bacterias como *Serratia plymuthica* y varias especies de *Pseudomonas* descritas como biocontroladores producen el antibiótico pirrolnitrina, que inhibe el crecimiento micelial de *B. cinerea* (Ajouz et al., 2010).

Inducción de resistencia

Las plantas tienen la capacidad de responder a una gran variedad de estímulos químicos producidos por los microorganismos asociados a estas, ya sean saprófitos, promotores de crecimiento vegetal y cepas de los patógenos no virulentas. Estos estímulos inducen las defensas de la planta mediante cambios bioquímicos que potencian la resistencia contra la infección posterior de diferentes fitopatógenos, tanto del suelo como de la filósfera e, incluso, protegen contra el ataque de los insectos fitófagos (Elad & Stewart, 2004).

Las respuestas de defensa pueden ser de naturaleza local, denominada *resistencia sistémica adquirida* (SAR) o *resistencia sistémica inducida* (ISR), dependiendo del tipo y cantidad del estímulo. La SAR está mediada por el ácido salicílico, un compuesto que se produce

tras la infección de un patógeno y que conduce a la expresión a la activación de varios genes responsables de la síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis, que incluyen enzimas como peroxidasas, quitinasas, proteasas y β -1,3-glucanasas, que pueden actuar directamente para lisar las células del patógeno, para reforzar la pared celular con el fin de resistir la infección, o para inducir muerte celular localizada (Pal & Gardener, 2006).

El efecto de la actividad en la inducción de respuestas de defensa se ha demostrado para diferentes bacterias; por ejemplo, Ramarathnam, Fernando y de Kievit (2011) obtuvieron los mejores resultados en el control del pie negro de la canola producido por *Phoma lingam*, cuando realizaron aplicaciones de *Pseudomonas chlororaphis* (cepas DF 190 y PA23), de *B. cereus* (cepa DFE4) y de *B. amyloliquefaciens* (cepa DFE16). En un principio se suponía que, dado que estas bacterias producen una gran variedad de antibióticos, este modo sería el causante de la actividad de biocontrol; sin embargo, la protección se observó en aquellas partes de la planta que no habían sido inoculadas con las bacterias, demostrando el efecto de inducción de resistencia sistémica.

Con *Trichoderma* spp. se ha logrado un progreso significativo en la comprensión de los mecanismos de acción implicados en la inducción de resistencia (De Meyer, Bigirimana, Elad, & Höfte, 1998). Varios de ellos se describirán a continuación, en un caso de estudio con la cepa T39 de *T. harzianum*. Navazio et al. (2007) descubrieron, en el caso de *T. atroviride*, el efecto de metabolitos complejos secretados en las células vegetales, que detectan las moléculas producidas por el biocontrolador, mediante cambios intracelulares de Ca^{2+} , y que las células vegetales tienen la capacidad de discriminar señales, originadas en la interacción con uno o dos hongos y modular sus respuestas de defensa. De hecho, se sabe que la interacción planta-*Trichoderma* spp. se correlaciona con los cambios con el proteoma y con el transcriptoma de la planta (Shoresh et al., 2010).

Cambios en la superficie de las plantas

El comportamiento de los patógenos en la superficie de plantas puede cambiar cuando los agentes de control biológico modifican las propiedades de dicha

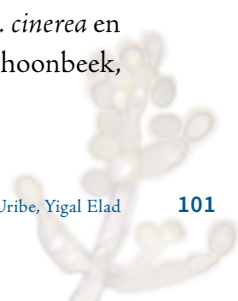
superficie. Por ejemplo, *Bacillus brevis*, aplicado a col china, produce gotas de agua que se extienden y secan, cambiando la humectabilidad de la superficie de las plantas (Edwards & Seddon, 1992). Además, la unión de microorganismos al patógeno puede estar implicada en varios mecanismos de control biológico; en este caso, la unión de las levaduras *Rhodotorula glutinis* y *Cryptococcus albidus* a los conidios de *B. cinerea* se asocia con la formación de un material fibrilar, que al parecer es una matriz extracelular de tipo polisacárido (MEC) que produce el patógeno. Según sugirió Elad (1996), esta matriz se trata de una lectina; Meyer, Fischer, Barbul y Elad (2001), al analizar la interacción entre *Trichoderma* y *B. cinerea* mediante microscopía electrónica, demostraron que *Trichoderma* se adhiere a dicha matriz, reduciendo la penetración del tejido por parte del patógeno.

Reducción de la producción del inóculo patogénico

La reducción en la producción de inóculo patogénico ha sido demostrada en *Botrytis* spp., que es comúnmente policíclico, por lo que dicha reducción puede crear un efecto acumulativo sobre varios ciclos de enfermedad (Köhl & Fokkema, 1993). También se ha demostrado que varios microorganismos suprimen la conidiación de *B. cinerea* en fresa (Peng & Sutton, 1991) y en otros cultivos (Morandi et al., 2000). *Ulocladium atrum* redujo la esporulación de *B. cinerea* en hojas muertas de lirio y de cebolla expuestas a condiciones de campo; además, la colonización de tejido necrótico por *U. atrum* previene la colonización saprófita de esas hojas por *B. cinerea* (Köhl, Molhoek, Van der Plas, & Fokkema, 1995).

Otros modos de acción

Dado que uno de los factores de patogenicidad producido por *B. cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum* es el ácido oxálico, se ha demostrado la capacidad que tienen varias bacterias biocontroladoras para degradarlo, lo que se tradujo en su actividad protectora contra *B. cinerea* en pepino, vid, tomate y *Arabidopsis thaliana* (Schoonbeek, Jacquat-Bovet, Mascher, & Métraux, 2007).



Modo de acción de *T. harzianum* T39, un caso de estudio

Uno de los casos más estudiados en relación con los mecanismos de acción de patógenos foliares es el de *Trichoderma harzianum* cepa T39, principio activo del

biofungicida Trichodex® (desarrollado por el Volcani Center de Israel), cuyo patógeno blanco es *B. cinerea*. Los modos de acción resumidos se muestran en la figura 1.15.

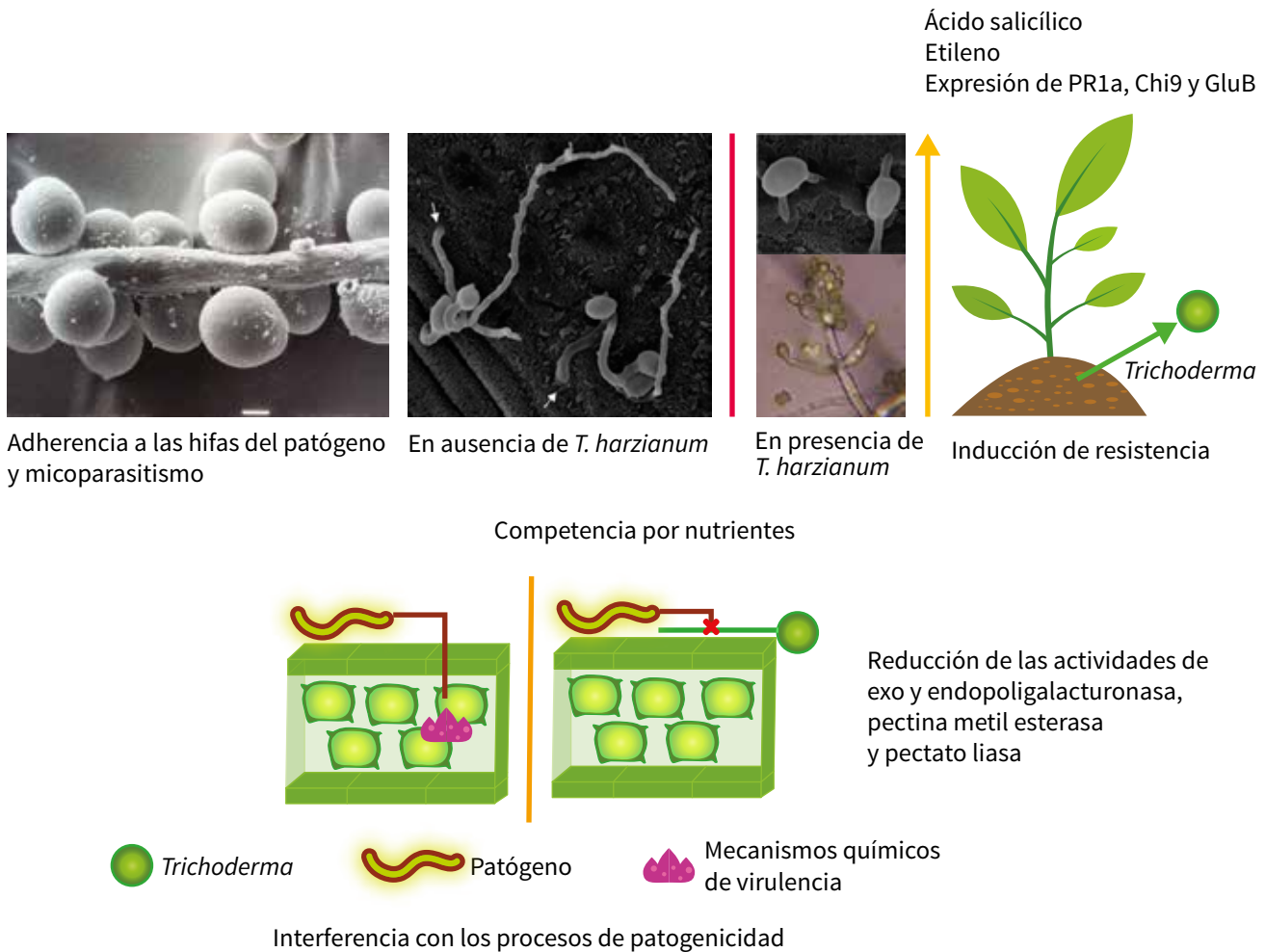


Figura 1.15. Modos de acción utilizados por *T. harzianum* T39 en el control de patógenos foliares.

Fuente: Elaboración propia

Mediante diferentes estudios, se ha demostrado que la actividad de *T. harzianum* T39 contra patógenos foliares está mediada por varios modos de acción, y que esta cepa es capaz de adherirse y micoparasitar al patógeno (figura 1.14).

No obstante, esta ejerce modos de acción diversos, algunos de los cuales no habían sido descritos previamente para otros agentes de control biológico (Elad, 2000a). Estos mecanismos incluyen:

Resistencia inducida

Este fenómeno ocurre tanto local como sistémicamente y se demostró cuando se aplicaron células vivas (figura 1.16) o muertas de T39 a las raíces de varias plantas, obteniéndose supresión del moho gris en las hojas de fríjol, tomate y pimiento, y del mildew polvoso en las hojas de pepino, pimiento y tabaco (De Meyer et al., 1998; Elad, 2000a).

También se demostró que *T. harzianum* T39 participa en una compleja reprogramación transcripcional en vid (Palmieri et al., 2012), que afecta a las proteínas asociadas con respuestas a estrés, fotosíntesis, señalización redox y metabolismo energético (Perazzolli et al., 2012). Observaciones de la infección por *B. cinerea* en hojas cosechadas de plantas cultivadas en los suelos tratados con el biocontrolador revelaron el fenómeno de resistencia sistémica inducida contra *B. cinerea*, que se demostró por la expresión génica relacionada con el ácido salicílico (SA) y con etileno (ET), de una manera proporcional a la concentración de *Trichoderma* utilizada (Harel, Mehari, Rav-David, & Elad, 2014). *T. harzianum* T39 también tuvo efectos sobre la expresión de PR1a, Chi9 y GluB. La expresión de los genes EFR1 y ACO1, relacionados con ET, también fue inducida por T39. En el caso

de las interacciones *P. viticola* -vid - T39, ocurrió inducción de los genes Lox9 en plantas tratadas con el biocontrolador. Antes de la inoculación con *B. cinerea*, los genes sensibles a SA fueron inhibidos por T39 y, después de la inoculación con el patógeno, T39 indujo una fuerte expresión de los genes sensibles a SA (Perazzolli, Roatti, Bozza, & Pertot, 2011).

Interferencia con los procesos de patogenicidad

La cepa T39 de *T. harzianum* impide la penetración de *B. cinerea* en el tejido del huésped e interfiere con los procesos de patogenicidad (Zimand, Elad, & Chet, 1996). T39 redujo las actividades de exo y



Fotos: Yigal Elad

Figura 1.16. Resistencia sistémica inducida contra *Botrytis* sp. en el dosel. Izquierda: testigo sin aplicación del biocontrolador; derecha: efecto de resistencia inducida en el dosel cuando *T. harzianum* T39 fue aplicada al suelo.

endopoligalacturonasa, pectín-metil-esterasa y pectato liasa (Zimand et al., 1996), quitinasa, β -1,3-glucanasa y cutinasa, producida por *B. cinerea* (Kapat, Zimand, & Elad, 1998). Se demostró que *T. harzianum* T39 produjo una cisteín-proteasa que redujo la actividad patogénica relacionada con las enzimas de *B. cinerea* y el desarrollo subsecuente de la enfermedad (Elad & Kapat, 1999), como parte de su mecanismo de control biológico; esto fue demostrado al utilizar un inhibidor específico de la proteasa de T39 que anuló su actividad biocontroladora (Elad, Kirshner, Yehuda, & Szejnberg, 1998). Por otra parte, T39 también suprimió el estallido oxidativo causado por el ataque de *B. cinerea* (Lapsker & Elad, 2001).

Competencia

Esta cepa también mostró capacidad para competir por los nutrientes que *B. cinerea* requiere para ger-

minar (Elad & Kapat, 1999); de esta forma, afecta la germinación de los conidios del patógeno y su penetración en los tejidos de la planta (Zimand et al., 1996).

Es obvio que una combinación de estos modos de acción —y tal vez también de otros— sea responsable del control biológico; sin embargo, en el caso de la cepa T39, la actividad biocontroladora no estuvo relacionada con antibiosis, ni con micoparasitismo, a pesar de que este agente de control biológico es capaz de degradar polímeros de las paredes celulares fúngicas, como la quitina (Elad, 2000a).

Es probable que para cada enfermedad que T39 controla operen diferentes mecanismos de acción, si se tiene en cuenta que el mildew polvoso fue controlado por resistencia inducida, mientras que en el caso de necrótrofos, como *B. cinerea*, se demostró competencia, restricción de las enzimas de patogenicidad y resistencia inducida como los mecanismos involucrados en el control.

Algunas experiencias exitosas en el control de fitopatógenos foliares

La incorporación del control biológico en el manejo de fitopatógenos foliares ha permitido reducir las aplicaciones de plaguicidas de síntesis en diferentes sistemas productivos, aportando a la inocuidad y a su cadena de valor. A continuación, se mencionan algunas experiencias exitosas que han utilizado agentes de control biológico en el control de enfermedades foliares en diferentes cultivos.

Trichodex®

El aislamiento T39 de *T. harzianum* fue el primer agente de biocontrol que se desarrolló como bioplaguicida, con el nombre comercial de Trichodex®. Este fue comercializado, registrado y usado para el control de patógenos foliares en cultivos bajo invernadero y en viñedos. Trichodex® representa un modelo en el desarrollo de bioplaguicidas, respaldado por una sólida base científica liderada por el investigador Yigal Elad,

que contó además con una alianza con la empresa Makhteshim Agan Industries, de Israel, gracias a la cual se logró el desarrollo del producto y su lanzamiento.

Trichodex® se encuentra entre los primeros bioplaguicidas registrados para el control de fitopatógenos; sin embargo, tuvo que enfrentar cuellos de botella importantes para su implementación, lo que llevó a su retiro del mercado. Trichodex® consistió en un polvo mojable a base de conidios y fragmentos de micelio, compatible con las prácticas agrícolas regulares. Fue registrado para 20 países y su tecnología fue patentada en todos los países de destino. Los registros fueron generalmente para el control del moho gris (*Botrytis cinerea*) en cultivos a libre exposición de vid (uva para vino y uva de mesa), pero en algunos países el objetivo fueron cultivos bajo invernadero. El modo de acción de T39 es complejo y único (Elad, 2001).

A partir de 1986, los esfuerzos en el laboratorio de este investigador se centraron en el aislamiento de un agente

de control biológico que se utilizaría para el control de patógenos foliares. El patógeno fúngico *B. cinerea* fue elegido debido a su importancia agrícola. Los muchos aislamientos que se recolectaron de diversas plantas y partes de plantas se probaron en bioensayos, y algunos de ellos mostraron potencial para el control de *B. cinerea*. El contacto con la industria se estableció en una etapa inicial, mediante un convenio con la empresa Makhteshim Agan Industries (Beer Sheva, Israel), con el objetivo de desarrollar el bioplaguicida. La investigación y el desarrollo se llevaron a cabo en paralelo entre el Volcani Center (Yigal Elad), en cooperación con la Universidad Hebrea (Ian Chet), y por el personal de Makhteshim, dirigido por A. Cohen y H. Abir. Para ello se seleccionaron varios aislamientos de *T. harzianum* y se formularon inicialmente, con el fin de que pudieran aplicarse en condiciones similares a las comerciales.

El aislamiento T39 se eligió después de experimentos en viñedos e invernaderos de hortalizas. Los resultados de control obtenidos fueron publicados (Elad, 1994; Elad et al., 1993a). El personal de Makhteshim y sus agentes en todo el mundo llevaron a cabo ensayos de eficacia y, desde 1993, se logró el registro de Trichodex® en Argentina, Australia, Bulgaria, Estados Unidos, Chile, Colombia, Croacia, Chipre, Grecia, Guatemala, Hungría, Israel, Italia, Marruecos, Paraguay, Rumania, Turquía, Eslovenia, Sudáfrica y los Estados Unidos; en algunos otros países, el proceso de registro tardó más.

Los estudios toxicológicos de Trichodex® se desarrollaron para satisfacer las diversas demandas de todos los países de destino, incluidos Australia, la Unión Europea y Estados Unidos, entre otros. Además, se realizaron estudios para responder preguntas sobre las interacciones potenciales con la fauna natural, con poblaciones microbianas autóctonas, con las abejas polinizadoras y con los enemigos naturales de las plagas de los cultivos agrícolas priorizados, encontrando resultados que respaldaron la afirmación de que el producto era seguro para los cultivos, para los consumidores de productos agrícolas y para el medio ambiente. El desarrollo de la formulación de Trichodex® permitió mejorar y hacer consistente la actividad biocontroladora; su empaque al vacío permitió una prolongada vida útil y alta supervivencia en la planta. Dado que la formulación es un polvo que se dispersa fácilmente en agua, pudo ser aplicada con

equipos agrícolas regulares, generalmente utilizados para la aplicación de fungicidas (Elad, 2001).

La eficacia de Trichodex® para el control del moho gris en la vid se determinó en más de 130 experimentos, en 34 variedades, bajo diversas condiciones comerciales en todo el mundo (O'Neill et al., 1996). El bioplaguicida se aplicó generalmente en cuatro etapas: 1) al final de la floración, 2) al cierre de racimos, 3) al comienzo de la maduración de las bayas y 4) dos a tres semanas después. En algunos experimentos, se hicieron aplicaciones adicionales durante la floración o 1-3 semanas antes de la cosecha. En todos los experimentos, se comparó la eficacia del bioplaguicida Trichodex® con la de los fungicidas estándar recomendados. Los experimentos también incluyeron tratamientos en los que *T. harzianum* T39 se integró con fungicidas químicos, aplicándolos de forma alternada. Además, se demostró que el bioplaguicida no afectó el proceso de fermentación del jugo de uva (desarrollo de la levadura, sabor del vino y producción de alcohol).

Cuando Trichodex® se evaluó en cultivos de invernadero, en general se registró control del moho gris en tomate, pepino y fresa, cuando se utilizó solo o alternado con fungicidas químicos. Fue muy efectivo en invernaderos de hortalizas que tenían control de temperatura y en sistemas de agricultura orgánica. Cuando Trichodex® se alternó con productos químicos (principalmente en invernaderos no calentados), se aplicaron las reglas basadas en un sistema de soporte de decisiones desarrollado por Shtienberg y Elad (1997), para adaptar el tiempo de aplicación del agente de biocontrol a las condiciones del invernadero. Además, Trichodex® fue eficaz contra *Sclerotinia sclerotiorum*, *Cladosporium fulvum* y *Pseudoperonospora cubensis* (Elad, 2000a, 2000b).

Uno de los obstáculos que tuvo que enfrentar Trichodex® estuvo relacionado con el largo tiempo que le llevó para penetrar en el mercado en muchos lugares del mundo, principalmente porque fue el primer producto de este tipo. En muchos países, las autoridades responsables del registro de productos fitosanitarios carecían de directrices y normas de registro apropiadas para los agentes de control biológico microbiano, ya que las únicas pautas que existían fueron diseñadas para plaguicidas. Además, las regulaciones relativas al registro varían de un país a otro e, incluso, pueden

variar dentro de un país, si un estado o provincia en particular decide imponer directrices más estrictas que las normas nacionales, como en el caso de California frente al resto de estados en EE. UU.

Por otra parte, dado que el bioplaguicida podía dirigirse a un mercado pequeño, las demandas de las autoridades en ciertos países plantearon una restricción económica sobre la viabilidad del registro; por ejemplo, en un país los costos de registro del producto (tarifas de registro y pruebas de eficacia aprobadas) fueron similares a los ingresos brutos esperados por las ventas del bioplaguicida, lo que lamentablemente no promovió la implementación del control biológico. Además, al ser un organismo vivo, el agente de control biológico se ve más afectado por factores ambientales y requiere atención diferente con respecto a su envío, almacenamiento y uso. Los posibles usuarios y distribuidores deben ser educados sobre su manejo y deben estar convencidos del valor de un producto de control biológico, a pesar de ser más difícil de usar que los plaguicidas estándar; por lo tanto, la adopción de tecnologías de control biológico por parte de los productores fue más lenta de lo esperado. De hecho, en muchos lugares, los agricultores, los asesores agrícolas e incluso los investigadores y el personal de campo no estaban acostumbrados a las demandas especiales de manipulación y uso impuestas por el agente de biocontrol en vivo. Por esta razón, las instrucciones especiales para el uso de Trichodex® tuvieron que ser formuladas y luego tuvieron que ser entregadas a lo largo de la cadena de comercialización, ventas e implementación.

La lección que se lleva a casa es que todos los involucrados en la "cadena de biocontrol", desde investigadores hasta personal de la industria, agencias de registro, vendedores, productores y consumidores, deben desempeñar papeles diferentes a los que jugaron en la "cadena de control químico" (Elad, 2001).

Tricotec®

Tricotec® es un biofungicida desarrollado por Corpoica, cuyo principio activo es el hongo *Trichoderma koningiopsis* cepa Th003, que cuenta con registro de uso ante el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA)

para el control de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*, en lechuga; *Rhizoctonia solani*, en tomate y arroz, y *Fusarium oxysporum*, en tomate.

Dados los atributos en el control de diferentes fitopatógenos, Tricotec® ha sido evaluado con éxito y ahora es utilizado en el control del moho gris en el cultivo de mora (figura 1.17). La principal alternativa de control de esta enfermedad ha sido la aplicación de fungicidas de síntesis química como Carbendazim, Benomil, Mancozeb, Difenconazol, Procloraz, entre otros; sin embargo, muchos de estos no están registrados para su uso en el cultivo. Adicionalmente, su uso supone graves limitantes dada las características propias de la planta y del patógeno (Zapata et al., 2013a).

Al tratarse de una planta de producción continua que produce dos cosechas por semana, la proximidad entre las aplicaciones de fungicidas, la cosecha de la fruta y su corto período poscosecha posibilitan que la fruta comercializada en los diferentes mercados presente residuos de estos plaguicidas, afectando así su inocuidad, constituyéndose adicionalmente en un riesgo para la salud de los consumidores. De acuerdo con esto, y buscando otra alternativa de control, se realizó la evaluación de la eficacia en el control del moho gris de Tricotec®, en dos cultivos comerciales en el municipio de Silvania, veredas Agua Bonita y Monterrico, (Cundinamarca, Colombia), teniendo como tratamientos testigo las aplicaciones de los fungicidas Procloraz y Difenconazol, y el tratamiento convencionalmente utilizado por el productor: Carbendazim.

Las aplicaciones de cada producto se realizaron con una frecuencia de cada quince días. El biofungicida se utilizó a una concentración de 1×10^7 conidios por mL^{-1} , mientras que los fungicidas se aplicaron según la dosis recomendada por la ficha técnica del fabricante, siendo la variable de evaluación la incidencia del moho gris, al determinar el porcentaje de frutos enfermos sobre el total de frutos cosechados semanalmente. Igualmente, se cuantificó la producción de fruta por tratamiento dos veces por semana durante tres meses, con el fin de determinar la diferencia de la fruta cosechada por tratamiento, encontrándose que Tricotec® presentó una mayor eficacia en la disminución de la incidencia de la enfermedad; además, tuvo una reducción de la incidencia superior al 60 %, comparado con los fungicidas



Fotos: Jimmy Zapata

Figura 1.17. Moho gris producido por *B. cinerea* en mora.

Procloraz, Difenconazol y Carbendazim, con los que se observó una reducción de la incidencia del 58,46 y 27%, respectivamente (Zapata & Cotes, 2013).

Por otra parte, en cuanto a la producción de fruta, la mayor cantidad cosechada se obtuvo en el tratamiento en el que se aplicó el biofungicida, con un promedio semanal de 5,6 kg, seguido del tratamiento Procloraz con 4,4 kg, mientras que en el tratamiento productor se obtuvo un promedio de 3,6 kg (cada tratamiento consistió de 30 plantas) (Zapata & Cotes, 2013). Estos resultados son muy satisfactorios, si se tiene en cuenta no solo la cantidad de fruta cosechada, sino el efecto en la reducción de las aplicaciones de funguicidas, lo que tendría un efecto positivo en la inocuidad de la fruta y puede constituir un atributo de valor agregado para algunos segmentos del mercado.

Asimismo, *T. koningiopsis* Th003 no solamente presenta actividad biocontroladora sobre diferentes fitopatógenos, sino que también ha mostrado un

efecto de promoción del crecimiento vegetal (Cotes, 2001; Moreno, Smith, & Cotes, 2010a). Teniendo en cuenta esta característica, el biofungicida fue evaluado con el propósito de mejorar las condiciones en el establecimiento de plántulas de mora producidas *in vitro*, y reducir las pérdidas durante la etapa de endurecimiento y siembra definitiva. Se observó que con las aplicaciones del producto, a una concentración de 1×10^6 conidios. mL^{-1} y con una frecuencia quincenal durante el primer mes del trasplante, se obtuvo mayor crecimiento, relacionado con valores de peso seco promedio de 0,22 g y con más del 47% en producción de biomasa, comparado con el testigo, que presentó 0,15 g de biomasa seca (Beltrán-Acosta & Cotes-Prado, 2009).

La inoculación del biofungicida Tricotec® en plantas de mora producidas *in vitro*, 35 días después del trasplante, presentó efectos benéficos en su crecimiento y en la adaptabilidad al sustrato (figura 1.18) (Beltrán-Acosta & Cotes-Prado, 2009).

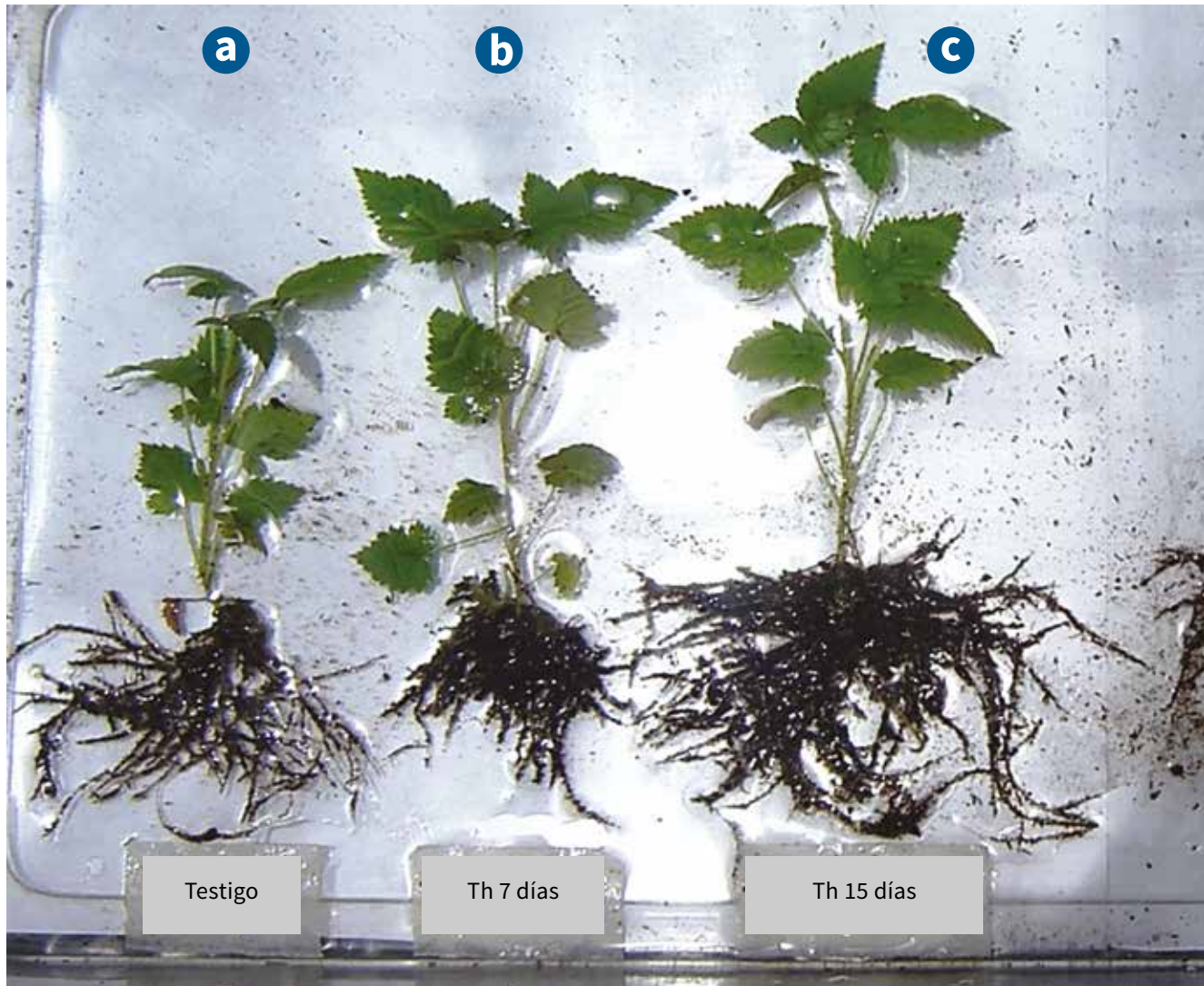


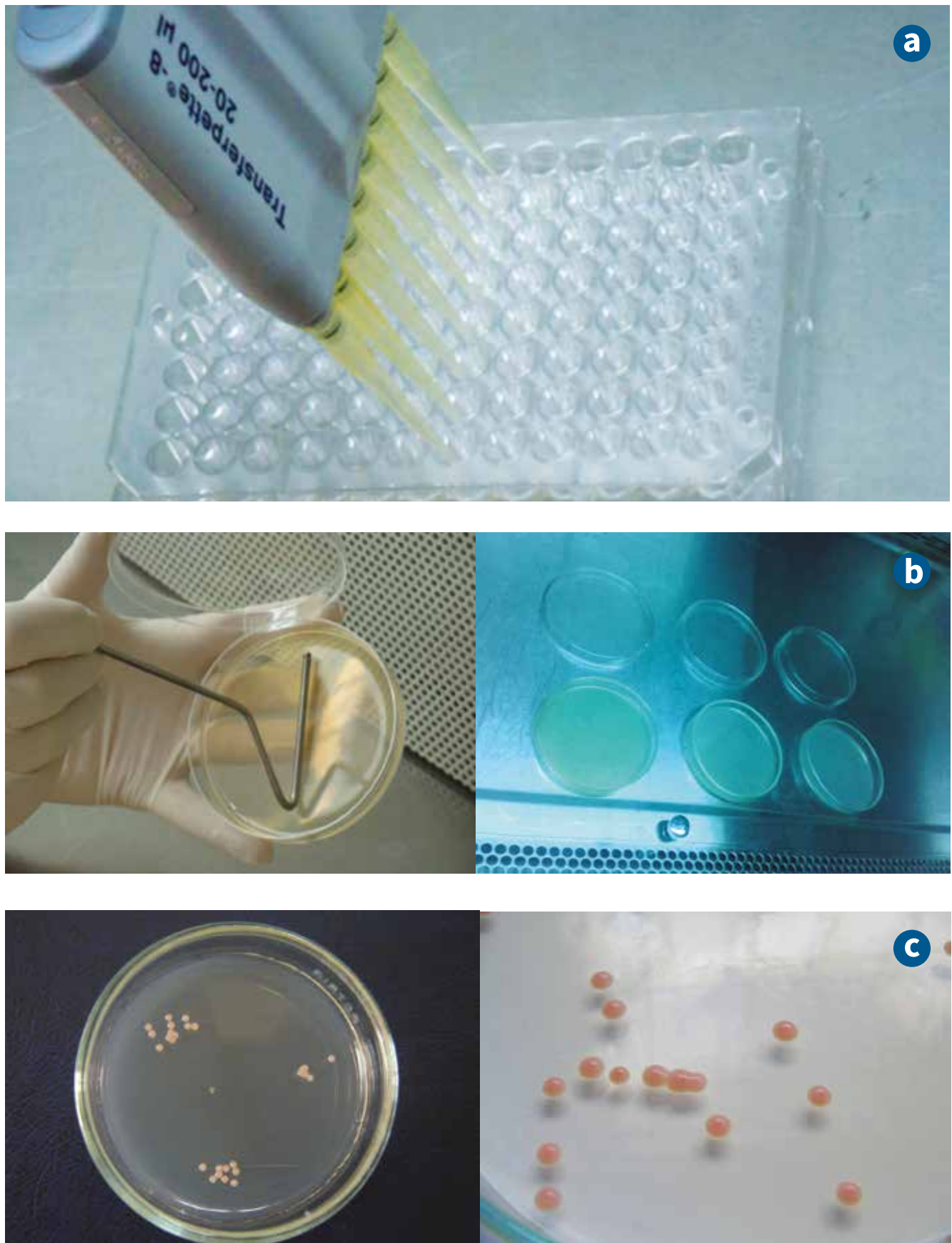
Figura 1.18. Efecto promotor de crecimiento del biofungicida Tricotec® en vitroplántulas de mora durante su endurecimiento (35 días). a. Testigo sin inocular; b. Aplicación de Tricotec® semanal; c. Aplicación de Tricotec® quincenal.

Prototipo de bioplaguicida a base de *Rhodotorula glutinis*

Con el propósito de contar con otro agente de control biológico que pudiera usarse de forma alternativa a Tricotec® para el control de *B. cinerea* en mora, se seleccionaron tres cepas de *Pichia onychis* y tres de *Rhodotorula glutinis* destacándose la cepa LV316 (antes codificada como LvCo7). Dicha selección se llevó a cabo a partir de una colección de 100 levaduras aisladas de la filósfera de mora y caracterizadas por los siguientes rasgos: un sistema de microfermentación por su capacidad de crecer a temperaturas entre 5 °C y 37 °C; rangos de pH de 3 a 9; actividad de agua

de 0,92 y 0,94; tolerancia a la luz ultravioleta tipo B (UVB) (figura 1.19); adherencia a la superficie foliar, y actividad biocontroladora sobre *B. cinerea* (Cotes et al., 2011; Zapata et al., 2011).

A estas levaduras se les evaluó su actividad biocontroladora contra *B. cinerea* en flores de mora; se inocularon a una concentración de 1×10^7 células. mL⁻¹. Al inocularlas 24 horas antes que *B. cinerea*, las levaduras redujeron la incidencia de la enfermedad entre un 49 y 75%, comparada con la presentada por el patógeno en ausencia de las levaduras, siendo nuevamente la levadura LvCo7 (sinónimo Lv316) la que presentó mayor protección (incidencia de 18%). Al determinar la compatibilidad de las levaduras con



Fotos: Grupo de Control Biológico de Corpoica

Figura 1.19. Caracterización ecofisiológica de las levaduras. a. Inoculación de las levaduras en microplacas con medio de cultivo con diferentes nutrientes, pH, Aw, y su incubación a diferentes temperaturas; b. Células de levadura sometidas durante 10 minutos de exposición a luz ultravioleta tipo B (UVB); c. Viabilidad de las levaduras expuestas a luz UVB , expresada como unidades formadoras de colonia, luego de su incubación a 25 °C por 48 h.

siete fungicidas, se observó que el crecimiento de la cepa Lv316 no se vio afectado por Benomil, Carbendazim, Difeconazol, Iprodión y Procloraz, mientras que Captan y Mancozeb inhibieron el crecimiento de todas las levaduras (Zapata et al., 2013a). Estos resultados permitieron seleccionar la levadura *R. glutinis* cepa Lv316 para desarrollar un prototipo de bioplaguicida para el control de *B. cinerea* en cultivos de mora. Se diseñó un medio de cultivo eficiente para la producción de biomasa de esta levadura mediante un sistema de tanque agitado; asimismo, se desarrolló un prototipo de formulación líquido que contiene un protector contra la radiación uvb (figura 1.20), que le confirió una protección del 62% frente a esta radiación; además, este prototipo tuvo estabilidad de 6 meses de almacenamiento a 8 °C (Zapata & Cotes, 2013).

Para evaluar la eficacia en el control de *B. cinerea* en cultivos de mora, se establecieron dos parcelas experimentales en el municipio de Silvania (Cundinamarca), sembrando plantas del ecotipo Monterrico, obtenidas a partir de vitroplantas. Después de 77 días de evaluación, el prototipo de formulación a base de la levadura mostró una alta eficacia para el control de *B. cinerea*, presentando una reducción de la incidencia entre 55 y 65%, comparado con la obtenida al usar los fungicidas químicos Plocloraz, Difenoconazol y Carbendazim, con los cuales se observó una reducción de la incidencia entre 26% y 45% (Zapata & Cotes, 2013).

Fungifree AB®

México es uno de los principales productores de mango a nivel mundial; sin embargo, para el 2013 solo el 29% de su producción fue exportada. La baja cantidad de exportación de este producto se debió a la alta incidencia de la antracnosis, enfermedad causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, que afecta severamente los rendimientos y calidad de la fruta (Comité Nacional Sistema Producto Mango [Conaspromango], 2012). Adicionalmente, a partir del 2005, países compradores de mango como Estados Unidos, Canadá y Japón restringieron el uso de fungicidas químicos al establecer “límites máximos de residuos” y al restringir el uso de algunas moléculas con acción fungicida (Conaspromango, 2012).

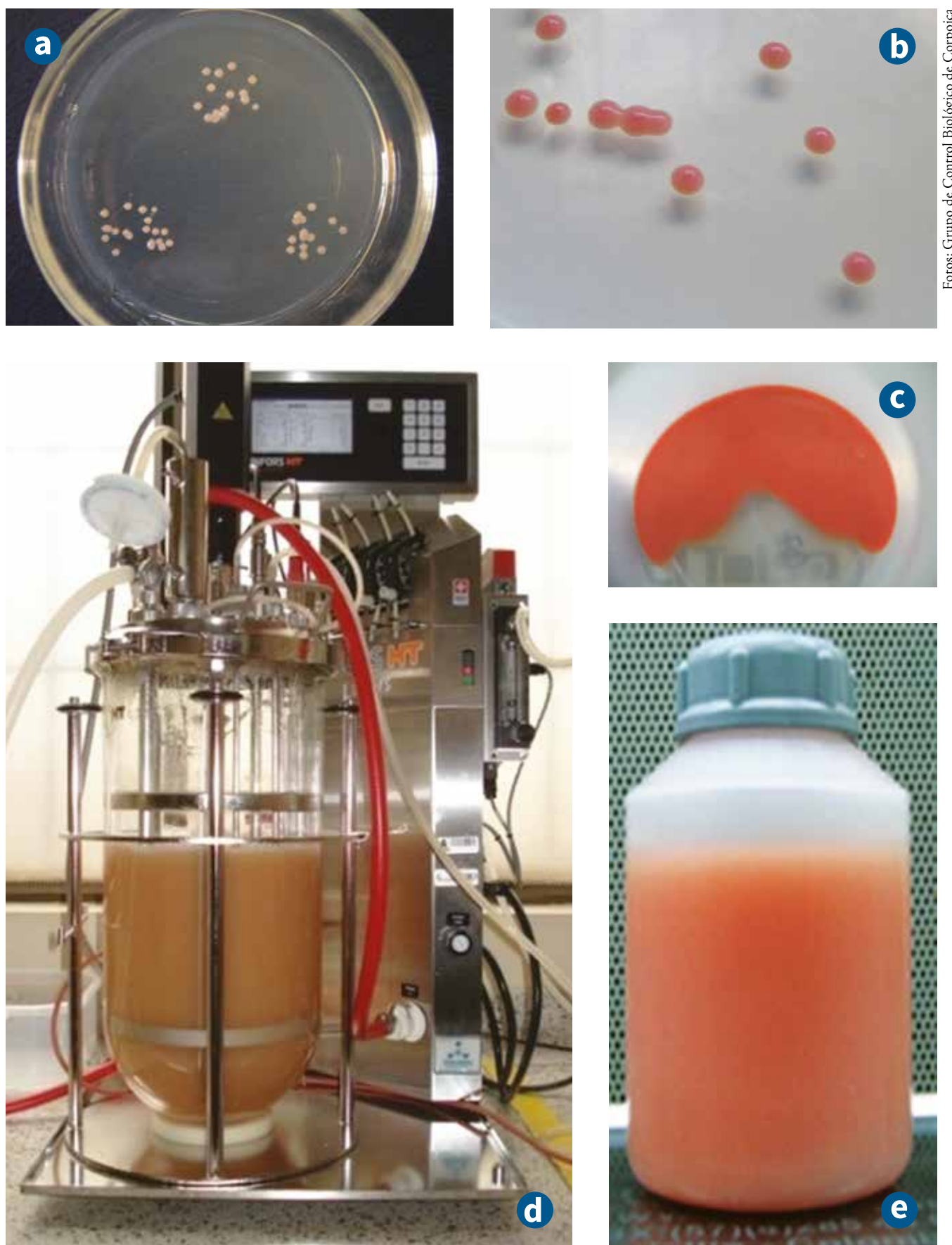
Bajo este panorama, un grupo de investigadores mexicanos aisló 200 cepas de microorganismos, entre bacterias y levaduras, a partir de la filósfera de mango colectada en cultivos localizados en diferentes regiones del Estado de Sinaloa (México), para seleccionar a partir de bioensayo *in vitro* e *in vivo* aquellos que tuvieran potencial de uso en las etapas de pre y poscosecha del mango. De esta forma, se seleccionaron siete aislamientos de bacterias (seis cepas de *Bacillus* sp., y una de *Pseudomonas* sp.) y una de levadura (*Rhodotorula minuta*) (Galindo et al., 2015).

Estos microorganismos fueron evaluados en campo y aplicados a intervalos regulares desde la floración hasta la cosecha, estrategia que busca proteger la planta de la infección y particularmente al fruto durante el proceso de maduración. Así, se obtuvo la mayor eficiencia en el control de la enfermedad al aplicar la cepa 83 de *Bacillus subtilis* y *Rhodotorula minuta* como concentrados líquidos, producidos en la planta piloto (Galindo et al., 2015; Patiño-Vera et al., 2005).

A pesar de que la formulación líquida de *B. subtilis* permitía reducir la severidad de la antracnosis en casi tres veces, con respecto a la obtenida con el control químico (Benomil) usado tradicionalmente para tratar la enfermedad, desde el punto de vista comercial no era la mejor opción en términos de la estabilidad a largo plazo del producto, por lo que se inició el desarrollo de una formulación sólida (Galindo et al., 2015). Esto llevó al desarrollo, registro y comercialización del producto innovador Fungifree AB®, cuyo principio activo es la bacteria *B. subtilis* cepa 83, y que se lanzó al mercado en noviembre del 2012 (Galindo et al., 2015).

Cuando se realizaron las pruebas necesarias para demostrar su eficacia en el control de la antracnosis en mango, tendientes al registro del bioplaguicida Fungifree AB®, se obtuvieron cosechas con un 80% de frutos con calidad de exportación, mientras que con el manejo convencional (químico) solo se obtuvo un 25% (Galindo et al., 2015).

En virtud de la eficiencia demostrada en mango contra la antracnosis, Fungifree AB® se evaluó en otros sistemas productivos y contra otras enfermedades. Esto permitió ampliar su registro de uso en cítricos como limón, mandarina, naranja y toronja para el control de la antracnosis producida por *C. acutatum*;



Fotos: Grupo de Control Biológico de Corpoica

Figura 1.20. Prototipo de bioplaguicida a base de *R. glutinis* Lv316. a y b. Aspecto macroscópico de la levadura; c. Producción masiva mediante fermentación líquida; d. Levadura separada del medio de cultivo; e. Prototipo de formulación.

en aguacate y papayo, también para el control de la antracnosis, pero producida por *C. gloeosporioides*; en el control del mildew polvoso en cultivos de calabaza, calabacín, melón, pepino y sandía, producido por *Erysiphe cichoracearum*, y en berenjena, chile, pimen-

tón, jitomate y tomate de mesa contra *Leveillula taurica*; asimismo, se registró para su uso en bayas como la fresa, frambuesa, zarzamora y arándanos para el control de *Colletotrichum fragariae*, *B. cinerea* y *Sphaerotheca macularis* (Galindo et al., 2015).

Bioplaguicidas registrados para el control de patógenos foliares. Comunidad Económica Europea y Estados Unidos de América

Dentro de los productos para reducir la dependencia a los insumos químicos, en especial fungicidas e insecticidas que son aplicados de manera recurrente en cultivos manejados convencionalmente, se han desarrollado varios bioplaguicidas para el control de enfermedades foliares, ya sea a base de agentes de control biológico individuales, en mezcla, utilizados como única estrategia o dentro de un enfoque de manejo integrado y sostenible, con productos químicos recomendables y compatibles de baja toxicidad (Woo et al., 2014).

Actualmente, entre la Comunidad Económica Europea y Estados Unidos de América hay disponibles 21 bioplaguicidas dirigidos al control de fitopatógenos foliares con registro de venta (tabla 1.3) (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos [EPA], 2017; Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria [EFSA], 2017). El 42,9% de la totalidad de estos tienen como principio activo bacterias; el 33,3%, hongos filamentosos; el 14,3%, levaduras, y solo dos están constituidos por actinomicetes (9,5%). La gran mayoría están formulados como gránulos y polvos humectables o dispersables en agua.

Los biocontroladores bacterianos incluyen nueve bioproductos a base de tres géneros: *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Pantoea*, siempre con base en una sola cepa como ingrediente activo. Los bioplaguicidas a base de *Bacillus* son cinco, dentro de los cuales están los siguientes:

- Subtilex[®], a base de *Bacillus amyloliquefaciens* (cepa MBI 600), se usa para el control del moho gris (*Botrytis* spp.) en uvas, que controla la enfermedad mediante colonización y competencia (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria [EFSA], 2016a).

- CX-9030[®] *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* cepa D747 (nombres alternos en EE.UU.: Double Nickel 55[®], Amylo-X[®], Bacstar[®]) se registró para el control de moho gris en uvas, mediante diferentes modos de acción, como competencia por espacio y nutrientes y producción de lipopéptidos y proteasas, que aumentan la permeabilidad y degradan la membrana de los hongos. Este también se recomienda para el control de mildew polvoso (*Erysiphe* spp., *Sphaerotheca* spp.) y del mildew vellosos (*Peronospora* spp., *Pseudoperonospora* spp.) en Brassicas, hortalizas de bulbo y de hoja y legumbres (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria [EFSA], 2014a).
- Taegro 2[®], con ingrediente activo *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* cepa FZB24, es recomendado para el control de mildew vellosos y polvosos, en hortalizas de hoja, papa y ornamentales, y de *B. cinerea* en uvas, cuando se aplica de manera preventiva y en etapas iniciales de la enfermedad (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria [EFSA], 2017a).
- Serenade[®], a base de *Bacillus subtilis* (QST 713), se registró para el manejo del moho gris en diversos cultivos como uvas, tomate, berenjena y fresa. Actúa como fungistático y fungitóxico por el rompimiento de hifas de los patógenos presentes en la superficie foliar; además, se recomienda para el control de mildew vellosos (*Bremia lactucae*, *Peronospora* spp. y *Plasmopara viticola*) y del mildew polvoso (*Uncinula necator*, *Erysiphe* spp., *Sphaerotheca* spp., *Oidiopsis taurica*, *Leveillula taurica*, *Podosphaera leucotricha*, *Oidium* spp., *Podosphaera* spp.) en hortalizas, nueces, plantas ornamentales, árboles y arbustos, y plantas tropicales (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria [EFSA], 2006).

- Sonata®, a base de *Bacillus pumilus* (QST 2808), presenta actividad antifúngica al producir un aminoazúcar que inhibe el metabolismo celular y que actúa en el control de mildew polvoso en uvas y cucurbitáceas, generando zonas de inhibición sobre las superficies de las plantas, evitando así el establecimiento de los patógenos en la planta (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria [EFSA], 2014b; EPA, 2017; EFSA, 2017a).

Por otra parte, se han registrado dos bioplaguicidas a base de *Pseudomonas* spp.:

- Proradix®, cuyo principio activo es la cepa DSMZ 13134 de *Pseudomonas* sp., se recomienda para el control de la gota causada por *Phytophthora*, en hojas y tallos de papa. Este actúa por competencia por nichos, producción de sideróforos promoción del crecimiento vegetal y resistencia inducida (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria [EFSA], 2016b).
- BlightBan®, a base de la bacteria *Pseudomonas fluorescens* cepa A506, se usa para el control del fuego bacteriano causado por *Erwinia amylovora*. Este compite por espacio y nutrientes en las flores y frutos de diversas especies de plantas de la familia Rosaceae, entre las cuales se encuentran perales (*Pyrus*), manzanos (*Malus*), membrillos (*Cydonia*), nísperos (*Eriobotrya* y *Mespilus*), cerezas, fresa, almendras y melocotón (*Prunus*). Esta también se recomienda para cultivos de tomate. Este género produce una variedad de antibióticos y metabolitos antifúngicos, implicados en la supresión de enfermedades (EPA, 2017).

Existen, además, los bioplaguicidas Bloomtime Biological® FD, a base de la cepa E325 de *Pantoea agglomerans*, y Blight C9-1® *Pantoea vagans* cepa C9-1 (antes *P. agglomerans*). El modo de acción de ambos antagonistas es la exclusión e inhibición competitiva por nicho y nutrientes, recomendados para el control del fuego bacteriano causado por *E. amylovora*. Es aplicado a las flores abiertas de pera o manzana y plantas relacionadas, y en arbustos frutales de bayas y drupas, donde coloniza rápidamente los tejidos florales (EPA, 2017; EFSA, 2017b). Además, la cepa C9-1 produce dos antibióticos: herbicolin O y herbicolin I, con efecto protectante (Ishimaru, Klos, & Brubaker, 1988), y tiene genes biosintéticos

importantes para metabolitos antibacterianos, como pantocina A y dapdiamida E (Smits et al., 2010).

Los bioplaguicidas a base de hongos están constituidos por cinco géneros diferentes, que son el insumo o principio activo de siete formulaciones. Estas contienen microorganismos en mezcla (dos formulaciones mixtas a base de dos diferentes especies de *Trichoderma*), o a base de un solo microorganismo, con cinco diferentes bioplaguicidas registrados (EPA, 2017; EFSA, 2017b). Tal es el caso de Bioten® WP y cuatro nombres alternativos: Bio-Tam® 2.0, Tenet® WP, Remedier® WP y Tenet T&O®; este bioplaguicida contienen una mezcla de *T. asperellum* cepa ICC 012 (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria [EFSA], 2014e) y *T. gamsii* cepa ICC 080 (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria [EFSA], 2014g), que presentan control sobre la enfermedad cuando se aplican en la poda de la vid; además, controla la enfermedad causada por *Phaeoemoniella chlamydospora*, que causa daños localizados en la parte basal del patrón de las plantas de vid y en plantas injertadas, ocasionando un retraso en el desarrollo, brotes con entrenudos cortos, hojas cloróticas y de menor tamaño y, en ocasiones, la muerte de la cepa de vid (EPA, 2017; EFSA, 2017b).

Otros productos a base de *Trichoderma* spp. son Binab T®, constituido por *T. polysporum* (IMI 206039) (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria [EFSA], 2014h) y *T. atroviride* (IMI 206040) (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria [EFSA], 2014f). Este bioplaguicida se recomienda para el control de *B. cinerea* en flores y frutos de fresa, así como en el control de *Chondrostereum purpureum*, causante de la enfermedad hoja de plata que afecta ramas de árboles de la familia Rosaceae, particularmente del género *Prunus* (cerezas y ciruelas) y en árboles de manzanos y peros. También controla a *Didymella*, que causa infección en todas las partes foliares de plantas de pepino, produce amarillamiento y marchitamiento de las hojas, además de lesiones café oscuro y hundidas en la base de la planta, que pueden expandirse y rodear el tallo al nivel del suelo o por encima de este. En estas lesiones se observan numerosos picnidios. Las esporas del hongo formadas en los picnidios pueden pasar al fruto, hojas y tallos, causando infecciones adicionales y la propagación de la enfermedad (EPA, 2017; EFSA, 2017b).

El bioproducto Incept®, a base de *Trichoderma hamatum* cepa 382, se recomienda para ser usado en invernadero y vivero; controla varias enfermedades foliares como mildew polvoso y moho gris, y daños causados por bacterias en cultivos ornamentales. Se le atribuye capacidad de inducción de resistencia sistémica (ISR) (EPA, 2017).

Otros hongos filamentosos biocontroladores utilizados de forma individual han sido registrados como bioplaguicidas. Estos son AQ10® o M10®, cuyo principio activo es *Ampelomyces quisqualis* cepa M10 (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria [EFSA], 2004a). Actualmente, se utiliza este biofungicida AQ10® para el control de especies de los géneros *Brasillomyces*, *Erysiphe*, *Leveillula*, *Microsphaera*, *Phyllactinia*, *Podosphaera*, *Sphaerotheca* y *Uncinula*, así como los anamorfos *Oidiopsis* y *Oidium*, en cultivos de berenjena, calabacín, calabaza, fresa, melón, manzano, pepino, pimiento, rosal, sandía, tomate y vid (Narayanasamy, 2013). Además, se le atribuyen como principales modos de acción el hiperparasitismo y la producción de antibióticos de naturaleza lipopeptídica (iturinas, fengicinas y surfactinas), con acción tóxica sobre la membrana del hongo, generando poros que desestabilizan su integridad (EPA, 2017; EFSA, 2017b).

El producto Prestop®, a base de la cepa J1446 de *Gliocladium catenulatum*, es recomendado para el control preventivo de *Didymella* (*Mycosphaerella*), moho gris (*Botrytis* sp.) en fresas, hortalizas, especias y plantas ornamentales en invernadero y campo (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria [EFSA], 2004b). El bioplaguicida Botry-Zen®, a base de *Ulocladium oudemansii* cepa U39, se desarrolló específicamente para el control de *B. cinerea*, y compite por el mismo nicho ecológico y nutrientes; su uso se recomienda en cultivos de frutas (mora, arándano, grosellas, bayas, frambuesa), bulbos (ajo, puerros, cebollas, chalote), frutas cítricas (pomelos, limones, naranjas, lima, mandarina), cucurbitáceas (pepinos, melones y calabacín), entre otros cultivos como berenjena, pimiento, tomate, árboles frutales y de nueces, y plantas ornamentales.

Polyversum®, cuyo principio activo es *Pythium oligandrum* cepa DV74, aplicado al follaje de los cultivos, actúa en el control de diferentes patógenos como *Alternaria* spp., *Ascochyta* spp., *B. cinerea*, *Phoma*

spp., *Plasmopara viticola* y *Puccinia* spp.; debido a su capacidad micoparasítica y competitiva, el ingrediente activo moviliza los mecanismos de defensa y aumenta la resistencia de las plantas a los ataques de hongos patógenos de manera preventiva (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria [EFSA], 2013b; EPA, 2017; EFSA, 2017b).

En cuanto a agentes a base de levaduras propiamente dichas o de microorganismos similares a levaduras, se han registrado cuatro productos a base de cuatro géneros. Tres de ellos contienen levaduras de manera individual. Nexy®, a base de *Candida oleophila* cepa O, es recomendado para el control de *B. cinerea* y *Penicillium expansum* en el manejo en campo o poscosecha de manzanas, peras y cítricos, principalmente a través de la competencia por nutrientes y espacio mediante la precolonización de sitios de daño o heridas de las plantas (Jijakli, Lepoivre, Tossut, & Thonard, 1993), además de la producción de β -1,3-glucanasas que degradan las paredes celulares de los hongos fitopatógenos contribuyendo en su actividad antagonista. (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria [EFSA], 2013a; Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos [EPA], 2009). Por otra parte, Ald1202®, a base de *Saccharomyces cerevisiae* cepa LAS02, es adecuado para uso en agricultura ecológica y para MIP, en el manejo de *Monilinia fructigena*, *Monilinia laxa*, *Monilinia fructicola*, *Botrytis* sp., *Alternaria* sp. *Neofabraea alba*, y *Penicillium* sp., aplicado en campo o en poscosecha por inmersión, empapado o pulverizado en frutas de pepa, frutas de hueso, uvas, tomate y fresa, donde actúa por competencia y colonización de las superficies de los frutos (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria [EFSA], 2015).

También a partir de *Pseudozyma flocculosa* cepa PF-A22 UL, aislada como epífita de la filósfera en trébol rojo (*Trifolium pratense*), distribuida ampliamente en América del Norte (Canadá y EE. UU.), se desarrolló el biofungicida Sporodex®, siendo un hiperparásito y controlador de varios mildews polvosos como *Sphaerotheca pannosa* var. *Rosae*, *Sphaerotheca fuliginea*, *Erysiphe graminis* var. *Tritici* y *Erysiphe polygoni*, en las superficies aéreas de plantas como pepino y rosa en ecosistemas agrícolas de libre exposición o de invernadero. Esta levadura es un micoparásito que colapsa las estructuras del patógeno, ocasionándole muerte mediante la secreción de tres

ácidos grasos C-17 insaturados fungitóxicos (ácido 9-heptadecenoico, ácido 6-metil-9-heptadecenoico y ácido 4-metil-7,11heptadecadienoico) y un norterpeneo acíclico (2, 6, 10, 14, 18-pentametil-2, 6, 8, 10, 12, 14, 17-nonadecahepteno-1,19-diol). Las fungitoxinas afectan las membranas plasmáticas y los orgánulos citoplásmicos dentro de los 30 minutos de exposición. Después de 24 horas, la respuesta inhibidora incluye pérdida de proteínas y electrolitos, haciendo que las células colapsen rápidamente y se produzca la muerte como resultado de la actividad de las fungitoxinas sobre las membranas y lípidos celulares. La sensibilidad a los ácidos grasos libres C-17 insaturados está relacionada con un alto grado de insaturación de los ácidos grasos fosfolípidos y una baja proporción de esteroides (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos [EPA], 2002).

El producto con formulación mixta de levaduras, denominado Blossom protect®, a base de las cepas DSM 14940 y DSM 14941 de *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans*, es recomendado para el tratamiento bactericida preventivo de *Erwinia amylovora* en flores de frutas de hueso. Estas levaduras compiten con el patógeno por inhibición competitiva (espacio

y nutrientes) (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria [EFSA], 2013b; EPA, 2017; EFSA, 2017b).

De los bioplaguicidas a base de Actinomicetes solamente existen dos. El primero, constituido por *Streptomyces* sp. cepa K61, cuyo nombre comercial es Mycostop®, se recomienda para el control de *Botrytis* en hojas, flores y frutos de tomate y otras hortalizas, plantas ornamentales y en flores como Gerbera; este compite por espacio y nutrientes, y presenta micoparasitismo mediado por la producción de metabolitos que alteran las paredes celulares del patógeno, inhibiéndolo (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria [EFSA], 2014c). El segundo es Actinovate® AG, a base de *Streptomyces lydicus* cepa WYEC108, que se recomienda para aplicaciones en invernadero, vivero y campo, en el control preventivo de enfermedades foliares como mildew polvoso y veloso y las causadas por *Botrytis* spp., *Monilinia* sp., *Alternaria* sp., *Mycosphaerella*, *Pseudomonas* sp., y *Xanthomonas* spp., en cultivos de cucurbitáceas, brasicáceas, hortalizas de hoja y de fruto, especias, uvas, bayas, árboles cítricos, frutas de hueso y de pomo, y cereales (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria [EFSA], 2014d; EPA, 2017; EFSA, 2017b).

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.)

Ingrediente activo	Cepa	Nombre comercial / formulación registro Unión Europea (UE)	Nombre comercial / formulación / Estados Unidos de América (EE. UU.)
Hongo			
<i>Ampelomyces quisqualis</i>	M10	AQ10® WG	M10® WG
<i>Gliocladium catenulatum</i>	J1446	Prestop® WG	
<i>Pythium oligandrum</i>	DV 74		Polyversum®
<i>Trichoderma hamatum</i>	382		Incept®
<i>Trichoderma asperellum</i> <i>Trichoderma gamsii</i>	ICC 012 ICC 080	Bioten®, Tenet® WP, Remedier®	Bioten® WP Nombres alternos: Bio-Tam® 2.0, Tenet® WP, Remedier WP, Tenet® T&O
<i>Trichoderma polysporum</i> <i>Trichoderma harzianum</i>	IMI 206039 IMI 206040	Binab T® WP	
<i>Ulocladium oudemansii</i>	U3		Botry-Zen® Nombre alterno: Zen-O-Spore®

(Continúa)

(Continuación tabla 1.3)

Ingrediente activo	Cepa	Nombre comercial / formulación registro Unión Europea (UE)	Nombre comercial / formulación / Estados Unidos de América (EE. UU.)
Levadura			
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>pullulans</i>	DSM 14940 DSM 14941	Blossom protect® WG	
<i>Candida oleophila</i>	O	Nexy® WG	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	LAS02	ALD1202® WG	
<i>Pseudozyma flocculosa</i>	PF-A22 UL		Sporodex® L
Bacteria			
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	MBI 600	Subtilex® WP	Subtilex® NG WP
<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>amyloliquefaciens</i>	FZB 24	Taegro 2® WP	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>	D747	CX-9030® WG	CX-9030® WG, Nombres alternos: Double Nickel 55®, Amylo-X®, Bacstar®
<i>Bacillus pumilus</i>	QST 2808	Sonata® SC	Sonata® ASO Nombres alternos: Sonata®, BAY2100®, Ballad® Plus,
<i>Bacillus subtilis</i>	QST 713	Serenade® WP	Serenade® Garden WP Nombre alterno: Natria®
<i>Pantoea agglomerans</i>	E325		Bloomtime Biological® FD Biopesticide WP
<i>Pantoea agglomerans</i>	C9-1		Blight C9-1®
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	A506		BlightBan®
<i>Pseudomonas</i> sp.	DSMZ 13134	Proradix® WP	
Actinomicete			
<i>Streptomyces</i> sp.	K61	Mycostop® WP	
<i>Streptomyces lydicus</i>	WYEC 108		Actinovate® AG

WG: Gránulos humectables / dispersables en agua; WP: Polvos humectables; SC: Suspensión concentrada; L: Líquido.

Fuente: Adaptada de ESFA (2017b) y EPA (2017)

Conclusiones y perspectivas

A pesar de los importantes avances logrados en el control biológico de patógenos foliares, aún falta mucho por investigar, pues no hay una oferta de bioplaguicidas registrados para el control de varios de los fitopatógenos foliares considerados más limitantes a nivel mundial; tal es el caso de *Magnaporthe oryzae*, *Puccinia* spp., *Fusarium graminearum*, *Blumeria graminis*, *Mycosphaerella graminicola*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas oryzae*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas axonopodis* y *Erwinia amylovora*, entre otros. Por otra parte, muchos de los bioplaguicidas existentes tienen limitada vida útil e inconsistente actividad en campo, lo que sugiere limitaciones en el conocimiento ecofisiológico de los aislamientos usados como principios activos de dichos productos, problemas en su formulación y en los estudios de compatibilidad de estos con todas las prácticas utilizadas en el cultivo.

Los biocontroladores usados para el control de fitopatógenos foliares, además de ser eficientes contra una variedad de enfermedades del cultivo tratado, deben tener características tales como compatibilidad con los productos y prácticas de control que se usan en los cultivos. Estos deben ser capaces de mantenerse activos y de sobrevivir en presencia de los plaguicidas químicos y de los fertilizantes que se utilizan comúnmente en el cultivo; además, deben sobrevivir a los métodos culturales que se emplean.

Estos agentes de control biológico deben actuar lo suficientemente rápido para evitar que el patógeno alcance a afectar las plantas, pues una vez que este haya producido daño en el cultivo, normalmente será demasiado tarde para que el biocontrolador lo detenga. La resistencia inducida es un mecanismo importante de la actividad biocontroladora, ya que esta generalmente actúa contra varios tipos de patógenos e incluso contra insectos plaga.

Los patógenos que necesitan nutrientes para su germinación o para la penetración del tejido del huésped pueden verse afectados por un biocontrolador que es rápido para utilizar los nutrientes, por lo que esta característica podría incluirse para la selección de biocontroladores potenciales.

Dado que las condiciones medioambientales tienden a cambiar durante el desarrollo del cultivo y durante el curso de la enfermedad, se deben desarrollar tecnologías que le confieran tolerancia al biocontrolador frente a condiciones tales como cambios en la temperatura, en el nivel de humedad y en la radiación solar, así como frente a la sequía, presencia de diversos iones tóxicos y de productos químicos. La supervivencia en condiciones adversas es necesaria cuando el período de actividad del microorganismo biocontrolador es largo y cuando este debe persistir en función del período de actividad del patógeno y de las condiciones del tejido vegetal susceptible.



Los microorganismos biocontroladores pueden enfrentar antagonismo por parte de la microflora nativa presente en los sitios de aplicación. Por lo tanto, este debe tolerar la actividad antagonista de dicha microflora. La formulación podría ayudar a prolongar la vida útil del biocontrolador, así como a extender la duración de su actividad en condiciones ambientales variables y frente a la microflora competitiva.

Para resolver todos los cuellos de botella de los agentes de control biológico de fitopatógenos foliares, es necesario incrementar los esfuerzos de investigación básica y aplicada, promoviendo enfoques multidisciplinarios para integrar el control biológico dentro de una estrategia de manejo integrado de plagas y de manejo integrado del cultivo. Dentro de este contexto, se deben identificar las condiciones de la interacción del biocontrolador con la planta y con el patógeno para reducir la inconsistencia en la actividad biocontroladora. En este sentido, se puede sugerir la combinación del bioplaguicida en cuestión, con otros agentes de control biológico o con otras estrategias (químicas, físicas o culturales) de control. La resistencia inducida es un modo de acción prometedor que requiere ser explotado en las aplicaciones prácticas, pues la planta responde a algunas moléculas de señalización del biocontrolador. En este caso, la investigación puede dirigirse a ambos componentes del proceso de interacción. El estudio de la fracción de señalización en el microorganismo biocontrolador y su modificación pueden revelar un inductor más potente que desempeñe su función de señalización en una gama de condiciones más amplia. En el ámbito de reacción de la planta, la modificación de los genes que son importantes para la cascada de señalización de resistencia sistémica permitirá una respuesta más potente.

Por otra parte, dado que las técnicas de aplicación de los bioplaguicidas para el control de patógenos foliares suelen ser deficientes, lo que está relacionado con un déficit de conocimiento sobre el tipo de equipos, presiones y modo de uso de estos, se debe investigar este tema y comunicarlo a los agricultores y los vendedores de dichos productos. Es importante también desarrollar y difundir sistemas de soporte para la toma de decisiones sobre los momentos adecuados en que se deben aplicar los bioplaguicidas. Asimismo, es importante establecer parcelas para demostrar los beneficios del control biológico y conformar redes de agricultores que ayuden a la difusión de las prácticas exitosas. Es claro que, para que aumente el uso del control biológico, se requiere de asesores, asistentes técnicos y de agricultores más calificados, por lo que su capacitación es fundamental para el éxito de esta estrategia.

Agradecimientos

Los autores agradecen a AGROSAVIA en Colombia y al Volcani Center de Israel, así como a las agencias que han financiado las investigaciones desarrolladas en el tema. Asimismo, agradecen a sus grupos de trabajo por haber contribuido significativamente al logro de muchos de los resultados y estrategias de trabajo aquí planteados.



Referencias

- Abanda-Nkpwatt, D., Krimm, U., Coiner, H. A., Schreiber, L., & Schwab, W. (2006). Plant volatiles can minimize the growth suppression of epiphytic bacteria by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* in co-culture experiments. *Environmental and Experimental Botanic*, 56(1), 108-119. doi:10.1016/j.envexpbot.2005.01.010.
- Abdallah, M. E., Haroun, S. A., Gomah, A. A., El-Naggar, N. E., & Badr, H. H. (2013). Application of actinomycetes as biocontrol agents in the management of onion bacterial rot diseases. *Arch. Phytopathol. Plant Protection*, 46(15), 1797-1808. doi:10.1080/03235408.2013.778451.
- Abel, P. P., Nelson, R. S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S. G., ... Beachy, R. N. (1986). Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*, 232(4751), 738-744.
- Abriouel, H., Franz, C. M. A. P., Omar, N. B., & Gálvez, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus bacteriocins*. *FEMS Microbiology Review*, 35(1), 201-232. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x.
- Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA). (2002). *Pseudozyma flocculosa strain PF-A22 UL (PC Code 119196) Pseudozyma flocculosa strain PF-A22 UL (TGAI) SPORODEX L (EP)*. Recuperado de https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/decision_PC-119196_1-Sep-02.pdf.
- Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA). (2009). *Candida oleophila Strain O PC Code: 021010 office of pesticide programs biopesticides and pollution prevention division last updated*. Recuperado de https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/decision_PC-021010_15-Jul-09.pdf.
- Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA). (2017). *Pesticides*. Recuperado de <https://www.epa.gov/pesticides>.
- Agrios, G. N. (2015). *Plant pathology*. Londres, Inglaterra: Elsevier.
- Ajith, P., & Lakshmidevi, N. (2010). Effect of volatile and non-volatile compounds from *Trichoderma* spp. against *Colletotrichum capsici* incitant of anthracnose on bell peppers. *Nature and Science*, 8(9), 265-269.
- Ajouz, S., Nicot, P. C., & Bardin, M. (2010). Adaptation to pyrrolnitrin in *Botrytis cinerea* and cost of resistance. *Plant Pathology*, 59(3), 556-566. doi:10.1111/j.1365-3059.2009.02230.x.
- Aksu, Z., & Eren, A. T. (2007). Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochemical Engineering Journal*, 35(2), 107-113. doi:10.1016/j.bej.2007.01.004.
- Al-Awadhi, H., Al-Mailem, D., Dashti, N., Hakam, L., Eliyas, M., & Radwan, S. (2012). The abundant occurrence of hydrocarbon-utilizing bacteria in the phyllospheres of cultivated and wild plants in Kuwait. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 73, 73-79. doi:10.1016/j.ibiod.2012.05.016.
- Albano, S., Chagnon, M., De Oliveira, D., Houle, E., Thibodeau, P., & Mexia, A. (2009). Effectiveness of *Apis mellifera* and *bombus impatiens* as dispersers of the Rootshield® biofungicide (*Trichoderma harzianum*, strain T-22) in a strawberry crop. *Hellenic Plant Protection Journal*, 2(2), 57-66.
- Alfonzo, A., Conigliaro, G., Torta, L., Burruano, S., & Moschetti, G. (2009). Antagonism of *Bacillus subtilis* strain AG1 against vine wood fungal pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, 48, 155-158. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-2886.
- Ali, G. S., El-Sayed, A. S. A., Patel, J. S., Green, K. B., Ali, M., ... Norman, D. (2016). *Ex vivo* application of secreted metabolites produced by soil-inhabiting *Bacillus* spp. Efficiently controls foliar diseases caused by *Alternaria* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(12), 478-490. doi:10.1128/aem.02662-15.

- Ali, H., & Nadarajah, K. (2014). Evaluating the efficacy of *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* as biocontrol agents against *Magnaporthe grisea* in rice. *Australian Journal of Crop Science*, 8(9), 1324.
- Ali, N., Sorkhoh, N., Salamah, S., Eliyas, M., & Radwan, S. (2012). The potential of epiphytic hydrocarbon-utilizing bacteria on legume leaves for attenuation of atmospheric hydrocarbon pollutants. *Journal of Environmental Management*, 93(1), 113-120. doi:10.1016/j.jenvman.2011.08.014.
- Alippi, A. M., Perelló, A. E., Sisterna, N. M., Greco, N. M., & Cordo, C. A. (2000). Potential of Spore-forming bacteria as biocontrol agents of wheat foliar diseases under laboratory and greenhouse conditions. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 107(2), 155-169.
- Allard, H. A. (1915). Distribution of the virus of the mosaic disease in capsules, filaments, anthers, and pistils of affected tobacco plants. *Journal of Agricultural Research*, 5(6), 251-256.
- Anagnostakis, S. L. (1982). Biological control of chestnut blight. *Science*, 215(4532), 466-471. doi:10.1126/science.215.4532.466.
- Andrews, J. H. (1990). Biological control in the phyllosphere: Realistic goal or false hope? *Canadian Journal of Plant Pathology*, 12(3), 300-307. doi:10.1080/07060669009501004.
- Andrews, J. H. (1992). Biological control in the phyllosphere. *Annual Review of Phytopathology*, 30, 603-635. doi:10.1146/annurev.py.30.090192.003131.
- Andrews, J. H., & Harris, R. F. (2000). The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annual Review of Phytopathology*, 38, 145-180. doi:10.1146/annurev.pyto.38.1.145.
- Aoki, M., Tan, M., Fukushima, A., Hieda, T., Kubo, S., ... Mikami, Y. (1993). Antiviral substances with systemic effects produced by basidiomycetes such as *fomes fomentarius*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 57(2), 278-282. doi:10.1271/bbb.57.278.
- Ara, I., Bukhari, N. A., Aref, N., Shinwari, M. M., & Bakir, M. (2012). Antiviral activities of streptomycetes against tobacco mosaic virus (TMV) in *Datura* plant: Evaluation of different organic compounds in their metabolites. *African Journal of Biotechnology*, 11(8), 2130-2138. doi:10.5897/AJB11.3388.
- Arguelles-Arias, A., Ongena, M., Halimi, B., Lara, Y., Brans, A., ... Fickers, P. (2009). *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial Cell Factories*, 8, 63. doi:10.1186/1475-2859-8-63.
- Arnold, A. E., Maynard, Z., Gilbert, G. S., Coley, P. D., & Kursar, T. A. (2000). Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters*, 3(4), 267-274. doi:10.1046/j.1461-0248.2000.00159.x.
- Arya, S., & Parashar, R. (2002). Biological control of cotton bacterial blight with phylloplane bacterial antagonists. *Tropical Agriculture*, 79(1), 51-55.
- Ashwini, N., & Srividya, S. (2014). Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. *Biotechnology*, 4(2), 127-136. doi:10.1007/s13205-013-0134-4.
- Atlas, R. M., & Bartha, R. (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Madrid, España: Pearson-Addison Wesley.
- Audy, P., Palukaitis, P., Slack, S. A., & Zaitlin, M. (1994). Replicase-mediated resistance to potato virus Y in transgenic tobacco plants. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 7(1), 15-15. doi:10.1094/MPMI-7-0015.
- Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). (2004a). *Ampelomyces quisqualis* 4205/VI/98. Recuperado de <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=959>.
- Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). (2004b). *Gliocladium catenulatum* SANCO/10383/2004. Recuperado de <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1435>.
- Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). (2006). *Bacillus subtilis* SANCO/10184/2003. Recuperado de <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=986>.
- Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). (2013a). *Candida oleophila* strain O SANCO/10395/2013. Recuperado de <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1074>.
- Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). (2013b). *Pythium oligandrum* M1 SANCO/1864/08. Recuperado de <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1810>.
- Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). (2014a). *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*

- strain D747. SANCO/11391/2014. Recuperado de <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=2252>.
- Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). (2014b). *Bacillus pumilus* QST 2808 SANCO/12800/2013. Recuperado de <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=2253>.
- Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). (2014c). *Streptomyces* K61 (formerly *Streptomyces griseoviridis*) SANCO/1865/08. Recuperado de <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1895>.
- Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). (2014d). *Streptomyces lydicus* strain WYEC 108 SANCO/11427/2014. Recuperado de <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=2256>.
- Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). (2014e). *Trichoderma asperellum* (formerly *T. harzianum*) ICC012 SANCO/1842/08. Recuperado de <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1979>.
- Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). (2014f). *Trichoderma atroviride* IMI206040 (formerly *T. harzianum* IMI206040) SANCO/1866/08. Recuperado de <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1980>.
- Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). (2014g). *Trichoderma gamsii* ICC080, *Trichoderma asperellum* T25 and TV1, formerly *Trichoderma viride* strain ICC080, strain T-25 and strain TV1 SANCO/1868/08. Recuperado de <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1982>.
- Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). (2014h). *Trichoderma polysporum* IMI206039 SANCO/1867/08. Recuperado de <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1984>.
- Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). (2015). European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Saccharomyces cerevisiae* LAS02. *EFSA Journal*, 13(12), 4322-4329 doi:10.2903/j.efsa.2015.4322.
- Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). (2016a). *Bacillus amyloliquefaciens* strain MBI 600 SANTE/10008/2016. Recuperado de <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=2325>.
- Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). (2016b). *Pseudomonas* sp. strain DSMZ 13134 SANCO/11455/2013. Recuperado de <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1787>.
- Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). (2017a). *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB24 SANTE/12037/2016. Recuperado de <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=2324>.
- Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). (2017b). *Health and food safety*. Recuperado de <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.selection&language=EN>.
- Avelino, J., Cristancho, M., Georgiou, S., Imbach, P., Aguilar, L., Bornemann, G., ... Morales, C. (2015). The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008-2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. *Food Security*, 7(2), 303-321. doi:10.1007/s12571-015-0446-9.
- Avis, T. J., & Bélanger, R. R. (2002). Mechanisms and means of detection of biocontrol activity of *Pseudozyma* yeasts against plant-pathogenic fungi. *FEMS Yeast Research*, 2(1), 5-8. doi:10.1111/j.1567-1364.2002.tb00062.x.
- Avis, T. J., Caron, S. J., Boekhout, T., Hamelin, R. C., & Bélanger, R. R. (2001). Molecular and physiological analysis of the powdery mildew antagonist *Pseudozyma flocculosa* and related fungi. *Phytopathology*, 91(3), 249-254. doi:10.1094/PHYTO.2001.91.3.249.
- Baker, C. J., Staveland, J. R., & Mock, N. (1985). Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. *Plant Disease*, 69(9), 770-772.
- Baker, K. F. (1987). Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 25, 67-85. doi:10.1146/annurev.py.25.090187.000435.

- Barbieri, L., Battelli, M. G., & Stirpe, F. (1993). Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1154(3-4), 237-282. doi:10.1016/0304-4157(93)90002-6.
- Beachy, R. N. (1999). Coat-protein-mediated resistance to tobacco mosaic virus: discovery mechanisms and exploitation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 354(1383), 659-664. doi:10.1098/rstb.1999.0418.
- Beattie, G. A., & Lindow, S. E. (1995). The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. *Annual Review of Phytopathology*, 33, 145-172. doi:10.1146/annurev.py.33.090195.001045.
- Beever, R. E., & Weeds, P. L. (2004). Taxonomy and genetic variation of *botrytis* and *Botryotinia*. En Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, & N. Delen (Eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (pp. 29-52). Dordrecht, Holanda: Springer. doi:10.1007/978-1-4020-2626-3_3.
- Begerow, D., Bauer, R., & Boekhout, T. (2000). Phylogenetic placements of ustilaginomycetous anamorphs as deduced from nuclear LSU rDNA sequences. *Mycology Research*, 104(1), 53-60. doi:10.1017/S0953756299001161.
- Bélanger, R. R., Dufour, N., Caron, J., & Benhamou, N. (1995). Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: Indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. *Biocontrol Science and Technology*, 5(1), 41-54. doi:10.1080/09583159550040006.
- Belsare, S. W., Moniz, L., & Deo, V. B. (1980). The hyperparasite *Ampelomyces quisqualis* Ces. from Maharashtra State, India. *Biovigyanam*, 6(2), 173-176.
- Beltrán-Acosta, C. R., & Cotes-Prado, M. A. (2009). Promoción de crecimiento en endurecimiento de plántulas de mora producidas *in vitro* (efecto de la aplicación de *Trichoderma koningiopsis* Th003). En L. S. Barrero-Meneses (Ed.), *Caracterización, evaluación y producción de material limpio de mora con alto valor agregado* (pp. 57-63). Bogotá, Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica).
- Bhatt, D. D., & Vaughan, E. K. (1962). Preliminary investigations on biological control of grey mould (*Botrytis cinerea*) of strawberries. *Plant Disease Reporter*, 46, 342-345.
- Bilu, A., Dag, A., Elad, Y., & Shafir, S. (2004). Honey bee dispersal of biocontrol agents: An evaluation of dispensing devices. *Biocontrol Science Technology*, 14(6), 607-617. doi:10.1080/09583150410001682340.
- Bochow, H., El-Sayed, S. F., Junge, H., Stavropoulou, A., & Schmiedeknecht, G. (2001). Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. IV. Salt-stress tolerance induction by *Bacillus subtilis* FZB24 seed treatment in tropical vegetable field crops, and its mode of action. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 108(1), 21-30.
- Boddy, L. (2016). Pathogens of Autotrophs. En S. C. Watkinson, N. Money, & L. Boddy (Ed.), *The Fungi* (pp. 245-292). Boston, EE. UU.: Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-382034-1.00008-6.
- Boekhout, T. (1995). *Pseudozyma bandoni* emend. Boekhout, a genus for yeast-like anamorphs of ustilaginales. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 41(4), 359-366. doi:10.2323/jgam.41.359.
- Boland, G. J., & Hunter, J. E. (1988). Influence of *Alternaria alternata* and *Cladosporium cladosporioides* on white mold of bean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 10(2), 172-177. doi:10.1080/07060668809501750.
- Borriss, R. (2011). Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents in agriculture. En: D. K. Maheshwari (Ed.), *Bacteria in agronomy: Plant growth responses* (pp. 41-76). Berlin, Alemania: Springer. doi:10.1007/978-3-642-20332-9_3.
- Bradbury, J. F. (1986). *Guide to plant pathogenic bacteria*. Minnesota, EE. UU: CAB International, University of Minnesota.
- Brederode, F. T., Taschner, P. E. M., Posthumus, E., & Bol, J. F. (1995). Replicase-mediated resistance to Alfalfa Mosaic Virus. *Virology*, 207(2), 467-474. doi:10.1006/viro.1995.1106.
- Brent, K. J., & Hollomon, D. W. (2007). *Fungicide resistance: the assessment of risk*. Bruselas, Belgica: Global crop protection federation Brussels.
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W. X., Ji, L.H., Ding, S. W., & Baulcombe, D. C. (1998). Retracted: Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *The EMBO Journal*, 17(22), 6739-6746. doi:10.1093/emboj/17.22.6739.
- Brunner, K., Zeilinger, S., Ciliento, R., Woo, S. L., Lorito, M., Kubicek, C. P., & Mach, R. L. (2005). Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism

- and induction of plant systemic disease resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 3959-3965. doi:10.1128/aem.71.7.3959-3965.2005.
- Buck, J. W., & Andrews, J. H. (1999). Attachment of the yeast *Rhodosporidium toruloides* is mediated by adhesives localized at sites of bud cell development. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2), 465-471.
- Buck, J. W., & Burpee, L. L. (2002). The effects of fungicides on the phylloplane yeast populations of creeping bentgrass. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(6), 522-529. doi:10.1139/w02-050.
- Caffi, T., Legler, S. E., Bugiani, R., & Rossi, V. (2013). Combining sanitation and disease modelling for control of grapevine powdery mildew. *European Journal of Plant Pathology*, 135(4), 817-829. doi:10.1007/s10658-012-0124-0.
- Calvente, V., Benuzzi, D., & de Tosetti, M. I. S. (1999). Antagonistic action of siderophores from *Rhodotorula glutinis* upon the postharvest pathogen *Penicillium expansum*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 43(4), 167-172. doi:10.1016/S0964-8305(99)00046-3.
- Campbell, R. (1989). *Biological control of microbial plant pathogens*. Cambridge, Reino Unido: Cambridge University. doi:10.1017/CBO9780511608612.
- Cannon, P. F., Damm, U., Johnston, P. R., & Weir, B. S. (2012). *Colletotrichum* – current status and future directions. *Studies in Mycology*, 73, 181-213. doi:10.3114/sim0014.
- Cano, R., & Borucki, M. K. (1995). Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old dominican amber. *Science*, 268(5213), 1060-1064.
- Carisse, O., & Rolland, D. (2004). Effect of timing of application of the biological control agent microsphaeropsis ochracea on the production and ejection pattern of ascospores by *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, 94(12), 1305-1314. doi:10.1094/PHYTO.2004.94.12.1305.
- Carisse, O., Willman-Desbiens, W., Toussaint, V., & Otis, T. (1998). *Preventing Black Rot*. Quebec, Canadá: Agriculture and Agri-Food Canada.
- Carrer-Filho, R., Romeiro, R. S., & Garcia, F. A. O. (2008). Biocontrole de doenças de parte aérea do tomateiro por *Nocardioides thermophilacinus*. *Tropical Plant Pathology*, 33(6), 457-460. doi:10.1590/S1982-56762008000600010.
- Collins, D. P., & Jacobsen, B. J. (2003). Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet cercospora leaf spot. *Biological Control*, 26(2), 153-161. doi:10.1016/S1049-9644(02)00132-9.
- Comité Nacional Sistema Producto Mango (Conaspromango). (2012). *Plan rector nacional de sistema producto mango*. Colima, México: Comité Nacional del Sistema Producto Mango.
- Cook, R. J. (1988). Biological control and holistic plant-health care in agriculture. *American Journal of Alternative Agriculture*, 3(2-3), 51-62. doi:10.1017/S0889189300002186.
- Cooper, B., Lapidot, M., Heick, J. A., Dodds, J. A., & Beachy, R. N. (1995). Multivirus resistance in transgenic tobacco plants expressing a dysfunctional movement protein of tobacco mosaic virus. *Virology*, 206, 307-313.
- Cotes, A. M. (2001). Biocontrol of fungal plant pathogens - from the discovery of potential biocontrol agents to the implementation of formulated products. *IOBC Bulletin*, 24(3), 43-47.
- 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), 391-394.
- Cotes, A. M., Zapata, J., Díaz, A., García, M., Medina, C., ... Uribe, D. (2011). Selección de levaduras filósfericas con potencial para el control biológico de *Botrytis cinerea*. *Fitopatología Colombiana*, 35(2), 51-56.
- Cuéllar-Quintero, A., Álvarez-Cabrera, E., & Castaño-Zapata, J. (2011). Evaluación de resistencia de genotipos de plátano y banano a la Sigatoka negra. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 64(1), 5853-5865.
- Cullen, D., Berbee, F. M., & Andrews, J. H. (1984). *Chaetomium globosum* antagonizes the apple scab pathogen, *Venturia inaequalis*, under field conditions. *Canadian Journal of Botany*, 62(9), 1814-1818. doi:10.1139/b84-245.
- Cuppels, D. A., Higham, J., & Traquair, J. A. (2013). Efficacy of selected streptomycetes and a streptomycete+pseudomonad combination in the management of selected bacterial and fungal diseases of field tomatoes. *Biological Control*, 67, 361-372. doi:10.1016/j.biocontrol.2013.09.005.
- Chaparro, A. P., Carvajal, L. H., & Orduz, S. (2011). Fungicide tolerance of *Trichoderma asperelloides* and *T. harzianum* strains. *Agricultural sciences*, 2(3), 301-307. doi:10.4236/as.2011.23040.

- Chen, X. H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Schneider, K., Vater, J., ... Borriss, R. (2009). Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *Journal of Biotechnology*, 140(1-2): 27-37. doi:10.1016/j.jbiotec.2008.10.011.
- Chet, I., Benhamou, N., & Haran, S. (1998). Mycoparasitism and lytic enzymes. En G. E. Harman, C. P. Kubicek (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium* (pp. 153-171). Londres, Reino Unido: Taylor and Francis Ltd.
- Chitarra, G. S., Breeuwer, P., Nout, M. J. R., Van Aelst, A. C., ... Abee, T. (2003). An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10-20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* conidiospores. *Journal Applied Microbiology*, 94(2), 159-166. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01819.x.
- Daoust, R. A., & Hofstein, R. (1996). *Ampelomyces quisqualis*, a new biofungicide to control powdery mildew in grapes. En British Crop Protection Council (Ed.), *Brighton Crop Protection Conference, Pest and Diseases* (pp. 33-40). Farnham, Reino Unido: British Crop Protection Council.
- Dayarathne, M., Boonmee, S., Braun, U., Crous, P., Daranagama, D., ... Maharachchikumbura, S. (2016). Taxonomic utility of old names in current fungal classification and nomenclature: Conflicts, confusion & clarifications. *Mycosphere*, 7(11), 1622-1648. doi:10.5943/mycosphere/7/11/2.
- De Jong, J. C., McCormack, B. J., Smirnov, N., & Talbot, N. J. (1997). Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature*, 389, 244. doi:10.1038/38418.
- De Meyer, G., Bigirimana, J., Elad, Y., & Höfte, M. (1998). Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 104(3), 279-286. doi:10.1023/a:1008628806616.
- 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. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x.
- Défago, G., Berling, C. H., Burger, U., Haas, D., Kahr, G., ... Wüthrich, B. (1990). Suppression of black root rot of tobacco and other root diseases by strains of *Pseudomonas fluorescens*: potential applications and mechanisms. En D. Hornby (Ed.), *Biological control of soil-borne plant pathogens* (pp. 93-108). Wallingford, Reino Unido: CAB International.
- Dennis, C., & Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: II. Production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57(1), 41-IN44. doi:10.1016/S0007-1536(71)80078-5.
- Deom, C. M., Schubert, K. R., Wolf, S., Holt, C. A., Lucas, W. J., & Beachy, R. N. (1990). Molecular characterization and biological function of the movement protein of tobacco mosaic virus in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(9), 3284-3288.
- Dewey, F. M., & Grant-Downton, R. (2016). *Botrytis - Biology, Detection and Quantification*. En S. Fillinger & Y. Elad (Eds.), *Botrytis - the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems* (pp. 17-34). Cham, Suiza: Springer International Publishing.
- Dickinson, C. H., & Preece, T. F. (1977). *Microbiology of aerial plant surfaces*. Londres, Inglaterra: Academic Press. doi:10.1002/jobm.19770170712.
- Ding, S. W., Li, W. X., & Symons, R. H. (1995). A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant RNA virus facilitates long distance virus movement. *The EMBO Journal*, 14(23), 5762-5772.
- Dodd, S. L., Lieckfeldt, E., & Samuels, G. J. (2003). *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia*, 95(1), 27-40. doi:10.1080/15572536.2004.11833129.
- Doudoroff, M., & Palleroni, N. J. (1974). Genus I. *Pseudomonas migula*. En R. E. Buchanan & N. E. Gibbons (Eds.), *Bergey's manual of determinative bacteriology* (pp. 217-243). Baltimore, EE. UU.: Williams & Wilkins.
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., & Wilson, C. (2009). Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*, 52(2), 137-145. doi:10.1016/j.postharvbio.2008.11.009.
- Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G., & Kubicek, C. P. (2006). The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience*, 47, 55-64. doi:10.1007/S10267-006-0279-7.
- Duan, C. G., Wang, C. H., & Guo, H. S. (2012). Application of RNA silencing to plant disease resistance. *Silence*, 3, 5. doi:10.1186/1758-907X-3-5.
- Dubos, B. (1992). Biological control of *Botrytis*, State-of-the-art. En K. Verhoeff, N. Malathrakakis, & B. Williamson (Eds.), *Recent advances in Botrytis*

- research (pp. 169-178). Wageningen, Holanda: Pudoc Scientific Publishers.
- Duggar, B. M., & Armstrong, J. K. (1925). The effect of treating the Virus of Tobacco Mosaic with the juices of various plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 12(4), 359-366. doi:10.2307/2394061.
- Edwards, S., & Seddon, B. (1992). *Bacillus brevis* as biocontrol agent against *Botrytis cinerea* on protected Chinese cabbage. En K. Verhoeff, N. Malathrakis, & B. Williamson (Eds.), *Recent advances in Botrytis research* (pp. 267-271). Wageningen, Holanda: Pudoc Scientific Publishers.
- Eichenlaub, R., & Gartemann, K. H. (2011). The *Clavibacter michiganensis* subspecies: Molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 445-464. doi:10.1146/annurev-phyto-072910-095258.
- Elad, Y. (1990). Reasons for the delay in development of biological control of foliar pathogens. *Phytoparasitica*, 18(2): 99-105. doi:10.1007/bf02981226.
- Elad, Y. (1994). Biological control of grape grey mould by *Trichoderma harzianum*. *Crop Protection*, 13(1), 35-38. doi:10.1016/0261-2194(94)90133-3.
- Elad, Y. (1995). Mycoparasitism. En K. Kohmoto, R. P. Singh, & U. S. Singh, (Eds.), *Pathogenesis and host specificity in plant diseases: histopathological, biochemical, genetic and molecular basis* (pp. 289-307). Oxford, Reino Unido: Elsevier Science Ltd.
- Elad, Y. (1996). Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. *European Journal of Plant Pathology*, 102(8), 719-732. doi:10.1007/bf01877146.
- Elad, Y. (2000a). Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Protection*, 19(8), 709-714. doi:10.1016/S0261-2194(00)00094-6.
- Elad, Y. (2000b). *Trichoderma harzianum* T39 preparation for biocontrol of plant diseases-control of *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Cladosporium fulvum*. *Biocontrol Science and Technology*, 10(4), 499-507. doi:10.1080/09583150050115089.
- Elad, Y. (2001). *Trichodex: commercialization of Trichoderma harzianum* T39 – a case study. *Agrow report, biopesticides: Trends and opportunities*. Richmond, Reino Unido: PJB Publications Ltd.
- Elad, Y. (2003). Biocontrol of foliar pathogens: mechanisms and application. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 68(4 pt. A), 17-24.
- Elad, Y., & Freeman, S. (2002). Biological control of fungal plant pathogens. En F. Kempken (Ed.), *The Mycota, a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research. Vol. 11 Agricultural Applications* (pp. 93-109). Heidelberg, Alemania: Springer.
- Elad, Y., & Kapat, A. (1999). The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 105(2), 177-189. doi:10.1023/a:1008753629207.
- Elad, Y., Kirshner, B., Yehuda, N., & Sztejnberg, A. (1998). Management of powdery mildew and gray mold of cucumber by *Trichoderma harzianum* T39 and *Ampelomyces quisqualis* AQ10. *BioControl*, 43(2), 241-251. doi:10.1023/a:1009919417481.
- Elad, Y., Pertot, I., Cotes-Prado, A. M., & Stewart, A. (2016). Plant hosts of *Botrytis* spp. En S. Fillinger & Y. Elad, (Eds.), *Botrytis – the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems* (pp. 413-486). Cham, Suiza: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-23371-0_20.
- Elad, Y., & Shtienberg, D. (1995). *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables: chemical, cultural, physiological and biological controls and their integration. *Integrated Pest Management Review*, 1(1), 15-29. doi:10.1007/BF00140331.
- 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.
- Elad, Y., & Stewart, A. (2004). Microbial control of *Botrytis* spp. En: Y. Elad (Ed.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (pp. 223-240). Norwell, EE. UU.: Kluwer Academic Publishers.
- Elad, Y., & Zimand, G. (1991). Experience in integrated chemicalbiological control of grey mould (*Botrytis cinerea*). *WPRS Bulletin*, 14, 195-199.
- Elad, Y., & Zimand, G. (1992). Integration of biological and chemical control for grey mould. En K. Verhoeff, N. Malathrakis, & B. Williamson (Eds.), *Recent advances in Botrytis research* (pp. 272-276). Wageningen, Holanda: Pudoc Scientific Publishers.
- Elad, Y., Zimand, G., Zaqs, Y., Zuriel, S., & Chet, I. (1993a). Biological and integrated control of cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse condition. *Plant Pathology*, 42(3), 324-332. doi:10.1111/j.1365-3059.1993.tb01508.x.

- Elad, Y., Zimand, G., Zags, Y., Zuriel, S., & Chet, I. (1993b). Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. *Plant Pathology*, 42(3), 324-332. doi:10.1111/j.1365-3059.1993.tb01508.x.
- Elad, Y., Köhl, J., & Fokkema, N. J. (1994a). Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic bacteria and fungi. *European Journal Plant Pathology*, 100(5), 315-336. doi:10.1007/bf01876443.
- Elad, Y., Köhl, J., & Fokkema, N. J. (1994b). Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic yeasts. *Phytopathology*, 84(10), 1193-1200. doi:10.1094/Phyto-84-1193.
- Elmer, P. A. G., & Reglinski, T. (2006). Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology*, 55(2), 155-177. doi:10.1111/j.1365-3059.2006.01348.x.
- Errampalli, D., & Brubacher, N. R. (2006). Biological and integrated control of postharvest blue mold (*Penicillium expansum*) of apples by *Pseudomonas syringae* and cyprodinil. *Biological Control*, 36(1), 49-56. doi:10.1016/j.biocontrol.2005.07.011.
- Etchegaray, A., de Castro-Bueno, C., de Melo, I. S., Tsai, S. M., de Fátima-Fiore, M., ... Teschke, O., 2008. Effect of a highly concentrated lipopeptide extract of *Bacillus subtilis* on fungal and bacterial cells. *Archives of Microbiology*, 190(6), 611-622. doi:10.1007/s00203-008-0409-z.
- Farré-Armengol, G., Filella, I., Llusia, J., & Peñuelas, J. (2016). Bidirectional interaction between phyllospheric microbiotas and plant volatile emissions. *Trends Plant Science*, 21(10), 854-860. doi:10.1016/j.tplants.2016.06.005.
- Fenner, K., Canonica, S., Wackett, L. P., & Elsner, M. (2013). Evaluating pesticide degradation in the environment: Blind spots and emerging opportunities. *Science*, 341(6147), 752-758. doi:10.1126/science.1236281.
- Fernández, N. V., Mestre, M. C., Marchelli, P., & Fontenla, S. B. (2012). Yeast and yeast-like fungi associated with dry indehiscent fruits of *Nothofagus nervosa* in Patagonia, Argentina. *FEMS Microbiology Ecology*, 80(1), 179-192. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01287.x.
- 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.
- Filonow, A. B., Vishniac, H. S., Anderson, J. A., & Janisiewicz, W. J. (1996). Biological control of *Botrytis cinerea* in apple by yeasts from various habitats and their putative mechanisms of antagonism. *Biological Control*, 7(2), 212-220. doi:10.1006/bcon.1996.0086.
- Fincheira, P., Parra, L., Mutis, A., Parada, M., & Quiroz, A. (2017). Volatiles emitted by *Bacillus* sp. BCT9 act as growth modulating agents on *Lactuca sativa* seedlings. *Microbiological Research*, 203, 47-56. doi:10.1016/j.micres.2017.06.007.
- Fitch, M. M. M., Manshardt, R. M., Gonsalves, D., Slightom, J. L., & Sanford, J. C. (1992). Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. *Bio/Technology*, 10, 1466-1472. doi:10.1038/nbt1192-1466
- Flint, M. L. (1998). *Pests of the garden and small farm: a grower's guide to using less pesticide*. Oakland, EE. UU.: University of California, Agriculture and Natural Resources.
- Fokkema, N. J. (1993). Opportunities and problems of control of foliar pathogens with micro-organisms. *Pest Management Science*, 37(4), 411-416. doi:10.1002/ps.2780370416.
- Fravel, D. (1999). *Commercial biocontrol products for use against soilborne crop diseases*. Recuperado de <http://www.barc.usda.gov/psi/bpdl/bpdlprod/bioproduct.html>.
- Fravel, D. R. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 337-359. doi:10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924.
- Freeman, S., Minz, D., Kolesnik, I., Barbul, O., Zveibil, A., Maymon, M., ... Elad, Y. (2004). *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. *European Journal of Plant Pathology*, 110(4), 361-370. doi:10.1023/B:EJPP.0000021057.93305.d9.
- Fuchs, M., & Gonsalves, D. (1995). Resistance of transgenic hybrid squash zw-20 expressing the coat protein genes of zucchini yellow mosaic virus and watermelon mosaic virus 2 to mixed infections by both potyviruses. *Bio/Technology*, 13, 1466-1473. doi:10.1038/nbt1295-1466.
- Fujiwara, M., Kanamori, T., Ohki, S. T., & Osaki, T. (2001). Purification and partial characterization of

- figaren, an RNase-like novel antiviral protein from *Cucumis figarei*. *Journal of General Plant Pathology*, 67(2), 152-158. doi:10.1007/PL00013002.
- Fulcher, M. R., Cummings, J. A., & Bergstrom, G. C. (2017). First report of an *Alternaria* leaf spot of wheat in the U.S.A. *Plant Disease*, 101(7), 1326-1326. doi:10.1094/PDIS-10-16-1541-PDN.
- Gafni, A., Calderon, C. E., Harris, R., Buxdorf, K., Dafa-Berger, A., ... Levy, M. (2015). Biological control of the cucurbit powdery mildew pathogen *Podosphaera xanthii* by means of the epiphytic fungus *Pseudozyma aphidis* and parasitism as a mode of action. *Frontiers in Plant Science*, 6, 132. doi:10.3389/fpls.2015.00132.
- Galindo, E., Serrano-Carreón, L., Gutiérrez, C. R., Balderas-Ruíz, K. A., Muñoz-Celaya, A. L., ... Arroyo-Colín, J. (2015). Desarrollo histórico y los retos tecnológicos y legales para comercializar Fungifree AB®, el primer biofungicida 100% mexicano. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 18(1), 52-60.
- Gao, Y.-R., Han, Y.-T., Zhao, F.-L., Li, Y.-J., Cheng, Y., ... Wen, Y.-Q. (2016). Identification and utilization of a new *Erysiphe necator* isolate NAFU1 to quickly evaluate powdery mildew resistance in wild Chinese grapevine species using detached leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 98, 12-24. doi:10.1016/j.plaphy.2015.11.003.
- Garibaldi, L. A., Bartomeus, I., Bommarco, R., Klein, A. M., Cunningham, S. A., ... Woyciechowski, M. (2015). Editor's choice: Review: Trait matching of flower visitors and crops predicts fruit set better than trait diversity. *Journal of Applied Ecology*, 52(6), 1436-1444. doi:10.1111/1365-2664.12530.
- Garry, G., Forbes, G., Salas, A., Santa-Cruz, M., Pérez, W., & Nelson, R. J. (2005). Genetic diversity and host differentiation among isolates of *Phytophthora infestans* from cultivated potato and wild solanaceous hosts in Peru. *Plant Pathology*, 54(6), 740-748. doi:10.1111/j.1365-3059.2005.01250.x.
- Ghabrial, S. A., & Suzuki, N. (2009). Viruses of plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 353-384. doi:10.1146/annurev-phyto-080508-081932.
- Goldman, G. H., Temmerman, W., Jacobs, D., Contreras, R., Van Montagu, M., & Herrera-Estrella, A. (1993). A nucleotide substitution in one of the β -tubulin genes of *Trichoderma viride* confers resistance to the antimetabolic drug methyl benzimidazole-2-yl-carbamate. *Molecular and General Genetics*, 240(1), 73-80. doi:10.1007/bf00276886.
- Golemboski, D. B., Lomonosoff, G. P., & Zaitlin, M. (1990). Plants transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(16), 6311-6315. doi:10.1073/pnas.87.16.6311.
- Gómez-Expósito, R., Postma, J., Raaijmakers, J. M., & De Bruijn, I. (2015). Diversity and activity of *Lysobacter* species from disease suppressive soils. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1243. doi:10.3389/fmicb.2015.01243.
- Goodwin, S. B., Cohen, B. A., & Fry, W. E. (1994). Pan global distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(24), 11591-11595.
- Grant, T. J., & Costa, A. S. (1951). A mild strain of the tristeza virus of citrus. *Phytopathology*, 41, 114-122.
- Guamán-Burneo, C., & Carvajal-Barriga, J. (2009). Caracterización e identificación de aislados de levaduras carotenogénicas de varias zonas naturales del Ecuador. *Universitas Scientiarum*, 14(2-3), 11. doi:10.11144/javeriana.SC14-2-3.ceid.
- Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., & Dinooor, A. (2001). Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology*, 91(7), 621-627. doi:10.1094/PHYTO.2001.91.7.621.
- Guetsky, R., Shtienberg, D., Dinooor, A., & Elad, Y. (2002). Establishment, survival and activity of the biocontrol agents *Pichia guilliermondii* and *Bacillus mycoides* applied as a mixture on strawberry plants. *Biocontrol Science and Technology*, 12(6), 705-714. doi:10.1080/0958315021000039888.
- Gupta, B. M., Chandra, K., Verma, H. N., & Verma, G. S. (1974). Induction of antiviral resistance in *Nicotiana glutinosa* plants by treatment with *Trichothecium* polysaccharide and its reversal by actinomycin d. *Journal of General Virology*, 24(1), 211-213. doi:10.1099/0022-1317-24-1-211.
- Hahn, M. (2014). The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *Journal of Chemical Biology*, 7(4), 133-141. doi:10.1007/s12154-014-0113-1.
- Hajlaoui, M. R., & Bélanger, R. R. (1991). Comparative effects of temperature and humidity on the activity of three potential antagonists of rose powdery mildew. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 97(4), 203-208. doi:10.1007/bf01989818.
- Hajlaoui, M. R., & Bélanger, R. R. (1993). Antagonism of the yeast-like phylloplane fungus *Sporothrix flocculosa*

- against *Erysiphe graminis* var *tritici*. *Biocontrol Science and Technology*, 3(4), 427-434. doi:10.1080/09583159309355297.
- Hammami, W., Castro, C. Q., Rémus-Borel, W., Labbé, C., & Bélanger, R. R. (2011). Ecological basis of the interaction between *Pseudozyma flocculosa* and powdery mildew fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3), 926-933. doi:10.1128/aem.01255-10.
- Harel, Y. M., Mehari, Z. H., Rav-David, D., & Elad, Y. (2014). Induced systemic resistance against gray mold in tomato (*Solanum lycopersicum*) by benzothiadiazole and *Trichoderma harzianum* T39. *Phytopathology*, 104(2), 150-157. doi:10.1094/PHYTO-02-13-0043-R.
- Harman, G. E. (2000). Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, 84(4), 377-393. doi:10.1094/PDIS.2000.84.4.377.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 43-56. doi:10.1038/nrmicro797.
- Hashioka, Y., & Nakai, Y. (1980). Ultrastructure of pycnidial development and mycoparasitism of *Ampelomyces quisqualis* parasitic on Erysiphales. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, 21(3), 329-338.
- Heath, M. C., Howard, R. J., Valent, B., & Chumley, F. G. (1992). Ultrastructural interactions of one strain of *Magnaporthe grisea* with goosegrass and weeping lovegrass. *Canadian Journal of Botany*, 70(4), 779-787. doi:10.1139/b92-099.
- Hellwald, K.-H., & Palukaitis, P. (1995). Viral RNA as a potential target for two independent mechanisms of replicase-mediated resistance against cucumber mosaic virus. *Cell*, 83(6), 937-946. doi:10.1016/0092-8674(95)90209-0.
- Hemenway, C., Fang, R.-X., Kaniewski, W. K., Chua, N.-H., & Tumer, N. E. (1988). Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA. *The EMBO Journal*, 7(5), 1273-1280.
- Heydari, A., & Pessarakli, M. (2010). A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of Biological Sciences*, 10(4), 273-290. doi:10.3923/jbs.2010.273.290.
- Heye, C. C. (1982). *Biological control of the perfect stage of the apple scab pathogen, Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. Madison, Wisconsin, EE. UU.: University of Wisconsin.
- Hijwegen, T., & Buchenauer, H. (1984). Isolation and identification of hyperparasitic fungi associated with Erysiphaceae. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 90(2), 79-83. doi:10.1007/bf01999956.
- Hiltunen, L. H., Ojanpera, T., Kortemaa, H., Richter, E., Lehtonen, M. J., & Valkonen, J. P. T. (2009). Interactions and biocontrol of pathogenic *Streptomyces* strains cooccurring in potato scab lesions. *Journal of Applied Microbiology*, 106(1), 199-212.
- Hino, I., & Kato, H. (1929). Cicinnoboli parasitic on mildew fungi. *Bulletin of the Miyazaki Collegium of Agriculture and Forestry*, 1, 91-100.
- Hiradate, S., Yoshida, S., Sugie, H., Yada, H., & Fujii, Y. (2002). Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. *Phytochemistry*, 61(6), 693-698. doi:10.1016/S0031-9422(02)00365-5.
- Hirai, T., Hiashima, A., Itoh, T., Takahashi, T., Shimomura, T., & Hayashi, H. (1966). Inhibitory effect of blasticidin S on Tobacco Mosaic Virus multiplication. *Phytopathology*, 56(4), 1236-1239. doi:10.1016/0042-6822(68)90195-5.
- Hirano, S. S., & Upper, C. D. (2000). Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*—a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 64(3), 624-653. doi:10.1128/membr.64.3.624-653.2000.
- Hislop, E. C., & Cox, T. W. (1969). Effects of captan on the non-parasitic microflora of apple leaves. *Transactions of the British mycological society*, 52(2), 223-235. doi:10.1016/S0007-1536(69)80035-5.
- Hjeljord, L., & Tronsmo, A. (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. En G. E. Harman & C. P. Kubice (Eds.), *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications* (pp. 131-151). Londres, Reino Unido: Taylor & Francis Ltd.
- Hofstein, R., Daoust, R. A., & Aeschlimann, J. P. (1996). Constraints to the development of biofungicides: The example of "AQ10", a new product for controlling powdery mildews. *Entomophaga*, 41(3-4), 455-460. doi:10.1007/bf02765797.
- Hogenhout, S. A., Ammar, E. D., Whitfield, A. E., & Redinbaugh, M. G. (2008). Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annual*

- Review of Phytopathology*, 46, 327-359. doi:10.1146/annurev.phyto.022508.092135.
- Hokama, N., Kawano, S., & Tokashiki, I. (1993). Effectiveness of cross protection by a mild strain of Zucchini Yellow Mosaic Virus for Mosaic disease of pumpkin (Japanese). *Annals of Phytopathology of Society Japan*, 59, 323.
- Holmes, F. O. (1934). A masked strain of tobacco-mosaic virus. *Phytopathology*, 24, 845-873.
- Holtz, G., Coertze, S., & Williamson, B. (2007). The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. En: Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, & N. Delen (Eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (pp. 9-27). Dordrecht, Holanda: Springer. doi:10.1007/978-1-4020-2626-3_2.
- Hoog, G. S., & Guarro, J. (1995). *Atlas of clinical fungi*. Baarn, Holanda: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Horst, R. K. (2013). Powdery mildews. En R. K. Horst (Ed.), *Westcott's plant disease handbook*. Springer Netherlands (pp. 285-293). Dordrecht, Holanda: Springer. doi:10.1007/978-94-007-2141-8_40.
- Howard, R. J., Ferrari, M. A., Roach, D. H., & Money, N. P. (1991). Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proceedings of the national academy of sciences*, 88(24), 11281-11284.
- 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.
- Hughes, J. A., & Ollennu, L. A. A. (1994). Mild strain protection of cocoa in Ghana against cocoa swollen shoot virus—a review. *Plant Pathology*, 43(3), 442-457. doi:10.1111/j.1365-3059.1994.tb01578.x.
- Hull, R. (2014). *Plant Virology* (5.^a ed.). Boston, EE. UU.: Elsevier.
- Iáñez, E. (1998). *Curso de microbiología general. Acción de los agentes físicos sobre las bacterias (II)*. Recuperado de http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/microianez/18_micro.htm.
- Index Fungorum (IFS). (2017). *Index Fungorum*. Recuperado de <http://www.indexfungorum.org/Index.htm>.
- Inácio, J., Rodrigues, M. G., Sobral, P., & Fonseca, Á. (2004). Characterisation and classification of phylloplane yeasts from Portugal related to the genus *Taphrina* and description of five novel *Lalaria* species. *FEMS Yeast Research*, 4(4-5), 541-555. doi:10.1016/S1567-1356(03)00226-5.
- Ippolito, A., & Nigro, F. (2000). Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Crop Protection*, 19(8), 715-723. doi:10.1016/S0261-2194(00)00095-8.
- International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). (2017). *GM Approval Database*. Recuperado de <http://www.isaaa.org/gmap/provaldatabase/>.
- Ishimaru, C. A., Klos, E. J., & Brubaker, R. R. (1988). Multiple antibiotic production by *Erwinia herbicola*. *Phytopathology*, 78(6), 746-750. doi:10.1094/Phyto-78-746
- International Subcommittee on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy (ISTH). (2017). *Hypocrea/Trichoderma diversity. List of known species described by 2006*. Recuperado de <http://www.isth.info/bio-diversity/index.php>.
- Izuno, A., Tanabe, A. S., Toju, H., Yamasaki, M., Indrioko, S., & Isagi, Y. (2016). Structure of phyllosphere fungal communities in a tropical dipterocarp plantation: A massively parallel next-generation sequencing analysis. *Mycoscience*, 57(3), 171-180. doi:10.1016/j.myc.2015.12.005.
- Jackson, A. J., Walters, D. R., & Marshall, G. (1997). Antagonistic interactions between the foliar pathogen *Botrytis fabae* and isolates of *Penicillium brevicompactum* and *Cladosporium cladosporioides* on faba beans. *Biological Control*, 8(2), 97-106. doi:10.1006/bcon.1996.0481.
- Jackson, D., Skillman, J., & Vandermeer, J. (2012). Indirect biological control of the coffee leaf rust, *Hemileia vastatrix*, by the entomogenous fungus *Lecanicillium lecanii* in a complex coffee agroecosystem. *Biological Control*, 61(1), 89-97. doi:10.1016/j.biocontrol.2012.01.004.
- Jacobs, J. L., & Sundin, G. W. (2001). Effect of solar UV-B radiation on a phyllosphere bacterial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12), 5488-5496. doi: 10.1128/AEM.67.12.5488-5496.2001.
- Jacobsen, B. (2006). Biological control of plant diseases by phyllosphere applied biological control agents. En M. J. Bailey, A. K. Lilley, T. M. Timms-Wilson, P. T. N. Spencer-Phillips (Eds.), *Microbial Ecology of Aerial Plant Surfaces* (pp. 133-147). Londres, Reino Unido: CABI.

- Jacques, M., Kinkel, L. L., & Morris, C. E. (1995). Population sizes, immigration, and growth of epiphytic bacteria on leaves of different ages and positions of field-grown endive (*Cichorium endivia* var. *latifolia*). *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3), 899-906.
- Janisiewicz, W. J., Tworowski, T. J., & Sharer, C. (2000). Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. *Phytopathology*, 90(11), 1196-1200. doi:10.1094/PHYTO.2000.90.11.1196.
- Jarvis, W. R. (1977). *Botryotinia and Botrytis species: taxonomy, physiology, and pathogenicity*. Quebec, Canadá: Department of Agriculture of Canada.
- Jeleń, H., Błaszczuk, L., Chełkowski, J., Rogowicz, K., & Strakowska, J. (2014). Formation of 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PAP) and other volatiles by different *Trichoderma* species. *Mycological Progress*, 13(3), 589-600. doi:10.1007/s11557-013-0942-2.
- Jijakli, M., Lepoivre, P., Tossut, P., & Thonard, P. (1993). Biological control of *Botrytis cinerea* and *Penicillium* sp. on post-harvest apples by two antagonistic yeasts. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen (Rijksuniversiteit te Gent)*, 58(3b), 1349-1358.
- Jin, Y., Szabo, L. J., & Carson, M. (2010). Century-old mystery of *Puccinia striiformis* life history solved with the identification of *Berberis* spp. as an alternate host. *Phytopathology*, 100(5), 432-435. doi:10.1094/PHYTO-100-5-0432.
- Jones, D. G. (1993). *Exploitation of microorganisms*. London, United Kingdom: Springer science & business media. doi:10.1007/978-94-011-1532-2.
- Junqueira, N. T. V., & Gasparotto, L. (1991). Controle biológico de fungos estromáticos causadores de doenças foliares em seringueira. En: W. Bettiol (Ed.) *Controle biológico de doenças de plantas* (pp. 307-331, Vol. 1). Jaguariúna, Brasil: Embrapa-CNPDA.
- Kalogiannis, S., Tjamos, S. E., Stergiou, A., Antoniou, P. P., Ziogas, B. N., & Tjamos, E. C. (2006). Selection and evaluation of phyllosphere yeasts as biocontrol agents against grey mould of tomato. *European Journal of Plant Pathology*, 116(1), 69-76. doi:10.1007/s10658-006-9040-5.
- Kämpfer, P. (2006). The family Streptomycetaceae, Part I: Taxonomy. En: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes: Volume 3: Archaea. bacteria: Firmicutes, Actinomycetes* (pp. 538-604). Nueva York, EE. UU.: Springer. doi:10.1007/0-387-30743-5_22.
- Kaniewski, W., Lawson, C., & Thomas, P. (1993). Agronomically useful resistance in Russet Burbank potato containing a PLRV CP gene. Documento presentado en IX International Congress of Virology. Glasgow, Scotland.
- Kapat, A., Zimand, G., & Elad, Y. (1998). Biosynthesis of pathogenicity hydrolytic enzymes by *Botrytis cinerea* during infection of bean leaves and *in vitro*. *Mycology Research*, 102(8), 1017-1024. doi:10.1017/S0953756297006023.
- Karabulut, O. A., Tezcan, H., Daus, A., Cohen, L., Wiess, B., & Droby, S. (2004). Control of preharvest and postharvest fruit rot in Strawberry by *Metschnikowia fructicola*. *Biocontrol Science and Technology*, 14(5), 513-521. doi:10.1080/09583150410001682287.
- Keel, C., Schnider, U., Maurhofer, M., Voisard, C., Laville, J., Burger, U., ... Défago, G. (1992). Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-Diacetylphloroglucinol. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 5(1), 4-13.
- Kema, G., Annone, J., Sayoud, R., & Van Silfhout, C. (1996). Genetic variation for virulence and resistance in the wheat-*Mycosphaerella graminicola* pathosystem. I. Interactions between pathogen isolates and host cultivars. *Phytopathology*, 86(2), 200-212. doi:10.1094/Phyto-86-200.
- Kema, G., Sayoud, R., Annone, J., & Van Silfhout, C. (1996). Genetic variation for virulence and resistance in the wheat-*Mycosphaerella graminicola* pathosystem. II. Analysis of interactions between pathogen isolates and host cultivars. *Phytopathology*, 86(2), 213-220. doi:10.1094/Phyto-86-213
- Kerling, L. C. P. (1958). De microflora of het blad van *Beta vulgaris*. *Tijdschrift Over Plantenziekten*, 64, 402-410. doi:10.1007/bf02137361.
- Kevan, P., Kapongo, J., Al-mazra'awi, M., & Shipp, L. (2008). Honey bees, bumble bees, and biocontrol: New alliances between old friends. En R. James & T. L. Pitts-Singer (Eds.), *Bee pollination in agricultural ecosystems* (pp. 65-81). Oxford, Reino Unido: Oxford University Press.
- Khan, M. M. A. A., & Verma, H. N. (1990). Partial characterisation of an induced virus inhibitory protein, associated with systemic resistance in *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub. plants. *Annals of Applied Biology*, 117(3), 617-623. doi:10.1111/j.1744-7348.1990.tb04827.x.

- Khan, N., Mishra, A., & Nautiyal, C. S. (2012). *Paenibacillus lentimorbus* B-30488r controls early blight disease in tomato by inducing host resistance associated gene expression and inhibiting *Alternaria solani*. *Biological Control*, 62(2), 65-74. doi:10.1016/j.biocontrol.2012.03.010.
- Khoa, N. Đ., Giàu, N. Đ. N., & Tuấn, T. Q. (2016). Effects of *Serratia nematodiphila* CT-78 on rice bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Biological Control*, 103, 1-10. doi:10.1016/j.biocontrol.2016.07.010.
- Kim, J. J., Goettel, M. S., & Gillespie, D. R. (2007). Potential of *Lecanicillium* species for dual microbial control of aphids and the cucumber powdery mildew fungus, *Sphaerotheca fuliginea*. *Biological Control*, 40(3), 327-332. doi:10.1016/j.biocontrol.2006.12.002.
- Kinkel, L. L. (1997). Microbial population dynamics on leaves. *Annual Review of Phytopathology*, 35, 327-347. doi:10.1146/annurev.phyto.35.1.327
- Kiss, L. (1997). Graminicolous powdery mildew fungi as new natural hosts of *Ampelomyces* mycoparasites. *Canadian Journal of Botany*, 75(4), 680-683. doi:10.1139/b97-076.
- Kiss, L. (1998). Natural occurrence of *ampelomyces* intracellular mycoparasites in mycelia of powdery mildew fungi. *The New Phytologist*, 140(4), 709-714. doi:10.1046/j.1469-8137.1998.00316.x.
- Kiss, L. (2003). A review of fungal antagonists of powdery mildews and their potential as biocontrol agents. *Pest Management Science*, 59(4), 475-483. doi:10.1002/ps.689.
- Kiss, L., Russell, J. C., Szentiványi, O., Xu, X., & Jeffries, P. (2004). Biology and biocontrol potential of *Ampelomyces* mycoparasites, natural antagonists of powdery mildew fungi. *Biocontrol Science and Technology*, 14(7), 635-651. doi:10.1080/09583150410001683600.
- Klatt, B. K., Holzschuh, A., Westphal, C., Clough, Y., Smit, I., . . . Tcharntke, T. (2014). Bee pollination improves crop quality, shelf life and commercial value. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1775). doi:10.1098/rspb.2013.2440.
- Knudsen, G. R., & Hudler, G. W. (1987). Use of a computer simulation model to evaluate a plant disease biocontrol agent. *Ecological Modelling*, 35(1-2), 45-62. doi:10.1016/0304-3800(87)90090-1.
- Ko, H.-S., Jin, R.-D., Krishnan, H. B., Lee, S.-B., & Kim, K.-Y. (2009). Biocontrol ability of *Lysobacter antibioticus* HS124 against *Phytophthora* Blight is mediated by the production of 4-Hydroxyphenylacetic acid and several lytic enzymes. *Current Microbiology*, 59(6), 608-615. doi:10.1007/s00284-009-9481-0.
- Kobayashi, N., Hiramatsu, A., & Akatsuka, T. (1987). Purification and chemical properties of an inhibitor of plant virus infection from fruiting bodies of *Lentinus edodes*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51(3), 883-890. doi:10.1271/abb1961.51.883.
- Köhl, J., & Fokkema, N. J. (1993). Fungal interactions on living and necrotic leaves. En J. P. Blakeman & B. Williamson (Eds.), *Ecology of plant pathogens* (pp. 321-334). Oxon, Reino Unido: CABI.
- Köhl, J., Molhoek, W., Van der Plas, C., & Fokkema, N. (1995). Effect of *Ulocladium atrum* and other antagonists on sporulation of *Botrytis cinerea* on dead lily leaves exposed to field conditions. *Phytopathology*, 85(4), 393-400.
- Köhl, J., & Schlösser, E. (1989). Decay of sclerotia of *Botrytis cinerea* by *Trichoderma* spp. At low temperatures. *Journal of Phytopathology*, 125(4), 320-326. doi:10.1111/j.1439-0434.1989.tb01076.x.
- Kokalis-Burelle, N., Backman, P. A., Rodríguez-Kábana, R., & Ploper, L. D. (1992). Potential for biological control of early leafspot of peanut using *Bacillus cereus* and chitin as foliar amendments. *Biological Control*, 2(4), 321-328. doi:10.1016/1049-9644(92)90026-A.
- Korsten, L., De Villiers, E. E., Wehner, F. C., & Kotzé, J. M. (1997). Field sprays of *Bacillus subtilis* and fungicides for control of preharvest fruit diseases of avocado in South Africa. *Plant Disease*, 81(5), 455-459. doi:10.1094/PDIS.1997.81.5.455.
- Kovach, J., Petzoldt, R., & Harman, G. E. (2000). Use of honey bees and bumble bees to disseminate *Trichoderma harzianum* 1295-22 to Strawberries for *Botrytis* control. *Biological Control*, 18(3), 235-242. doi:10.1006/bcon.2000.0839.
- Krauss, U., & Soberanis, W. (2002). Effect of fertilization and biocontrol application frequency on cocoa pod diseases. *Biological Control*, 24(1), 82-89. doi:10.1016/S1049-9644(02)00007-5.
- Kubicek, C. P., & Penttila, M. (1998). Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*. En G. E. Harman & C. P. Kubicek (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium* (Chapter 3). Londres, Reino Unido: Taylor & Francis Ltd.
- Kubo, S., Ikeda, T., Imaizumi, S., Takanami, Y., & Mikami, Y. (1990). A potent plant virus inhibitor

- found in *Mirabilis jalapa* L. *Japanese Journal of Phytopathology*, 56(4), 481-487. doi:10.3186/jjphytopath.56.481.
- Kubota, K., Tsuda, S., Tamai, A., & Meshi, T. (2003). Tomato mosaic virus replication protein suppresses virus-targeted posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology*, 77(20), 11016-11026. doi:10.1128/jvi.77.20.11016-11026.2003.
- Kumar, A., & Purohit, A. K. (2012). The role of indigenous knowledge in biological control of plant pathogens: Logistics of new research initiatives. En: J. M. Méridon & K. G. Ramawat (Eds.), *Plant defence: Biological control* (pp. 161-194). Dordrecht, Holanda: Springer. doi:10.1007/978-94-007-1933-0_7.
- Kupferschmidt, K. (2013). A lethal dose of RNA. *Science*, 341(6147), 732-733. doi:10.1126/science.341.6147.732.
- Kutuzova, S. N., Porokhvinova, E. A., & Brutch, N. B. (2017). Evolution of virulence in a population of the flax rust pathogen *Melampsora lini* (Pers.) Lev. in northwestern Russia. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 7(2), 159-169. doi:10.1134/S207905971702006X.
- Labudova, I., & Gogorova, L. (1988). Biological control of phytopathogenic fungi through lytic action of *Trichoderma* species. *FEMS Microbiology Letters*, 52(3), 193-198. doi:10.1111/j.1574-6968.1988.tb02594.x.
- Lam, K. S. (2006). Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current in Opinion Microbiology*, 9(3), 245-251. doi:10.1016/j.mib.2006.03.004.
- Lam, Y.-H., Wong, Y.-S., Wang, B., Wong, R.N.S., Yeung, H.-W., & Shaw, P.-C. (1996). Use of trichosanthin to reduce infection by turnip mosaic virus. *Plant Science*, 114(1), 111-117. doi:10.1016/0168-9452(95)04310-1.
- Landry, C., Bonnot, F., Ravigné, V., Carlier, J., Rengifo, D., ... Abadie, C. (2017). A foliar disease simulation model to assist the design of new control methods against black leaf streak disease of banana. *Ecological Modelling*, 359(C), 383-397. doi:10.1016/j.ecolmodel.2017.05.009.
- Lapsker, Z., & Elad, Y. (2001). Involvement of reactive oxygen species and antioxidant process in the disease caused by *Botrytis cinerea* on bean leaves and in its biological control by means of *Trichoderma harzianum* T39. *Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens IOBC WPRS Bulletin*, 24(3), 21-25.
- Larone, D. H., & Howard, D. H. (1996). *Medically Important Fungi: A Guide to Identification*. Washington, D.C., EE. UU.: ASM Press.
- Law, J. W.-F., Ser, H.-L., Khan, T. M., Chuah, L.-H., Pusparajah, P., ... Lee, L.-H. (2017). The potential of *Streptomyces* as biocontrol agents against the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae* (*Pyricularia oryzae*). *Frontiers in Microbiology*, 8, 3. doi:10.3389/fmicb.2017.00003.
- Lee, G., Lee, S.-H., Kim, K.M., & Ryu, C.-M. (2017). Foliar application of the leaf-colonizing yeast *Pseudozyma churashimaensis* elicits systemic defense of pepper against bacterial and viral pathogens. *Scientific Reports*, 7, 39432. doi:10.1038/srep39432
- Lee, R. E. J., Warren, G. J., & Gusta, L. V. (1995). Bioquímica de nucleos de hielo bacteriales. En F. Ray & K. Paul (Eds.), *Nucleación biológica de hielo y sus aplicaciones* (pp. 63-83). St. Paul, Minnesota, EE. UU.: The American Phytopathological Society (APS).
- Legler, S. E., Caffi, T., Kiss, L., Pintye, A., & Rossi, V. (2011). Methods for screening new *Ampelomyces* strains to be used as biocontrol agents against grapevine powdery mildew. *IOBC/WPRS Bulletin*, 67(marzo), 149-154.
- Legler, S. E., Pintye, A., Caffi, T., Gulyás, S., Bohár, G., ... Kiss, L. (2016). Sporulation rate in culture and mycoparasitic activity, but not mycohost specificity, are the key factors for selecting *Ampelomyces* strains for biocontrol of grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*). *European Journal of Plant Pathology*, 144(4), 723-736. doi:10.1007/s10658-015-0834-1.
- Lelliott, R. A., & Dickey, R. S. (1984). Genus VII. *Erwinia*. En J. Holt (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (pp. 469-476). Filadelfia, EE. UU.: Wolters Kluwer Health.
- Lemanceau, P., Barret, M., Mazurier, S., Mondy, S., Pivato, B., ... Vacher, C. (2017). Chapter Five - plant communication with associated microbiota in the Spherosphere, Rhizosphere and Phyllosphere. *Advances in Botanical Research*, 82, 101-133. doi:10.1016/bs.abr.2016.10.007.
- Leonard, K. J., & Bushnell, W. R. (2003). *Fusarium head blight of wheat and barley*. St. Paul, EE. UU.: American Phytopathological Society (APS).
- Leroux, P. (2004). Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. En Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski & N. Delen, (Eds.), *Botrytis: Biology, pathology and control* (pp. 195-222).

- Dordrecht, Holanda: Springer. doi:10.1007/978-1-4020-2626-3_12.
- Leveau, J. H. J. (2007). Microbia communities in the phyllosphere. En M. Riederer & C. Müller (Eds.), *Annual plant reviews volume 23: Biology of the plant cuticle* (pp. 334-367). New Jersey, EE. UU.: Blackwell Publishing Ltd. doi:10.1002/9780470988718.ch11.
- Libkind, D. (2007). Evaluación de la técnica de MSP-PCR para la caracterización molecular de aislamientos de *Rhodotorula mucilaginosa* provenientes de la Patagonia noroccidental. *Revista Argentina de Microbiología*, 39(3), 133-137.
- Lindow, S., Hecht-Poinar, E., & Elliott, V. (2004). *Phyllosphere microbiology*. St. Paul, EE. UU.: American Phytopathological Society (APS).
- Lindow, S. E., & Andersen, G. L. (1996). Influence of immigration on epiphytic bacterial populations on navel orange leaves. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(8), 2978-2987.
- Lindow, S. E., & Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the Phyllosphere. *Applied Environmental Microbiology*, 69(4), 1875-1883. doi:10.1128/aem.69.4.1875-1883.2003.
- Lindow, S. E., & Leveau, J. H. J. (2002). Phyllosphere microbiology. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 238-243. doi:10.1016/S0958-1669(02)00313-0.
- Lo, C.-T. (1998). General mechanisms of action of microbial biocontrol agents. *Plant Pathology Bulletin*, 7(4), 155-166.
- 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.
- Louws, F. J., Rivard, C. L., & Kubota, C. (2010). Grafting fruiting vegetables to manage soilborne pathogens, foliar pathogens, arthropods and weeds. *Scientia horticulturae*, 127(2), 127-146. doi:10.1016/j.scienta.2010.09.023.
- Maiti, C. K., Sen, S., Paul, A. K., & Acharya, K. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* WS-1 for biological control of leaf blight disease of *Withania somnifera*. *Arch. Phytopathol. Plant Protection*, 45(7), 796-805. doi:10.1080/03235408.2011.597150.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., ... Foster, G. D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(6), 614-629. doi:10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x.
- 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.
- Martirosyan, V., & Steinberger, Y. (2014). Microbial functional diversity in the phyllosphere and lamosphere of different desert plants. *Journal of Arid Environments*, 107, 26-33. doi:10.1016/j.jaridenv.2014.04.002.
- Masih, E. I., Slezack-Deschaumes, S., Marmaras, I., Barka, E. A., ... Paul, B. (2001). Characterisation of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*, causing the grey mould disease of grapevine. *FEMS Microbiology Letters*, 202(2), 227-232. doi:10.1111/j.1574-6968.2001.tb10808.x.
- Mastouri, F., Björkman, T., & Harman, G. E. (2010). Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology*, 100(11), 1213-1221. doi:10.1094/PHYTO-03-10-0091.
- Matei, A., & Doehlemann, G. (2016). Cell biology of corn smut disease—*Ustilago maydis* as a model for biotrophic interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 34, 60-66. doi:10.1016/j.mib.2016.07.020.
- McCain, A. (1994). Powdery Mildew. HortScript # 3. California, EE. UU.: University of California Cooperative Extension Marin County.
- McCook, S. (2006). Global rust belt: *Hemileia vastatrix* and the ecological integration of world coffee production since 1850. *Journal of Global History*, 1(2), 177-195. doi:10.1017/S174002280600012X.
- McGuire, J. M., Kim, K. S., & Douthit, L. B. (1970). Tobacco ringspot virus in the nematode *Xiphinema americanum*. *Virology* 42(1), 212-216. doi:10.1016/0042-6822(70)90254-0.
- McKinney, H. H. (1929). Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa and Gibraltar. *Journal of Agricultural Research*, 39, 577-578.
- 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.
- McQuilken, M. P., Gemmell, J., & Lahdenperä, M. I. (2001). *Gliocladium catenulatum* as a potential biological control agent of damping-off in bedding

- plants. *Journal of Phytopathology*, 149(3-4), 171-178. doi:10.1046/j.1439-0434.2001.00602.x.
- McSpadden-Gardener, B. B., & Fravel, D. (2002). Biological control of plant pathogens: Research, commercialization, and application in the USA. *Plant health progress* (pp. 207-209). doi:10.1094/PHP-2002-0510-01-RV.
- Meena, B. (2014). Biological control of pest and diseases using fluorescent pseudomonads. En K. Sahayaraj (Ed.), *Basic and Applied Aspects of Biopesticides* (pp. 17-29). Nueva Delhi, India: Springer. doi:10.1007/978-81-322-1877-7_2.
- Mercier, J., & Lindow, S. E. (2000). Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), 369-374. doi:10.1128/aem.66.1.369-374.2000.
- Mew, T. W., Alvarez, A. M., Leach, J. E., & Swings, J. (1993). Focus on bacterial blight of rice. *Plant Disease*, 77(1), 5-12. doi:10.1094/PD-77-0005.
- Meyer, K. M., & Leveau, J. H. J. (2012). Microbiology of the phyllosphere: a playground for testing ecological concepts. *Oecologia*, 168(3), 621-629. doi:10.1007/s00442-011-2138-2.
- Meyer, U., Fischer, E., Barbul, O., & Elad, Y. (2001). Effect of biocontrol agents on antigens present in the extracellular matrix of *Botrytis cinerea*, which are important for pathogenesis. *IOBC WPRS Bulletin*, 24(3), 5-9.
- Miedtke, U., & Kennel, W. (1990). *Athelia bombacina* and *Chaetomium globosum* as antagonists of the perfect stage of the apple scab pathogen (*Venturia inaequalis*) under field conditions. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 97(1), 24-32.
- Milgroom, M. G., & Cortesi, P. (2004). Biological control of chestnut blight with hypovirulence: A critical analysis. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 311-338. doi:10.1146/annurev.phyto.42.040803.140325.
- Mizukami, T., & Wakimoto, S. (1969). Epidemiology and control of bacterial leaf blight of rice. *Annual Review of Phytopathology*, 7, 51-72. doi:10.1146/annurev.py.07.090169.000411.
- Mommaerts, V., Put, K., Vandeven, J., Jans, K., Sterk, G., ... Smagghe, G. (2010). Development of a new dispenser for microbiological control agents and evaluation of dissemination by bumblebees in greenhouse strawberries. *Pest Management Science*, 66(11), 1199-1207. doi:10.1002/ps.1995.
- Momono, K., Mori, M., Matsuura, K., Moriwaki, J., & Morikawa, T. (2015). Quantification of Mirafiori lettuce big-vein virus and its vector, *Olpidium virulentus*, from soil using real-time PCR. *Plant Pathology*, 64(4), 825-830. doi:10.1111/ppa.12333.
- Montesinos, E., & Bonaterra, A. (2009). Pesticides, Microbial. En *Reference module in life sciences* (pp. 110-120). Oxford, Reino Unido: Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.13087-0.
- Morandi, M. A. B., Sutton, J. C., & Maffia, L. A. (2000). Effects of host and microbial factors on development of *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinerea* in rose. *European Journal of Plant Pathology*, 106(5), 439-448. doi:10.1023/a:1008738513748.
- Moreno, C., & Cotes, A. (2006). Survival in the phylloplane of *Trichoderma koningii* and biocontrol activity against tomato foliar pathogens. *IOBC/WPRS Bulletin*, 30, 557-561.
- Moreno, C., Ramírez, J., Zapata, J., Diaz, A., & Cotes, A. (2012). Selection of *Pichia onychis* isolate for biological control of *Botrytis cinerea* based on its ecophysiological characteristics. *IOBC-WPRS Bulletin*, 78, 229-232.
- Moreno, C., Smith, A., & Cotes, A. M. (2010a). Pruebas de eficacia de *Trichoderma koningiiopsis* Th003 para el control del moho blanco de la lechuga. En C. A. Moreno & A. M. Cotes (Eds.), *Desarrollo de un bioplaguicida a base de Trichoderma koningiiopsis Th003 y uso en el cultivo de lechuga para el control del moho blanco (Sclerotinia sclerotiorum y Sclerotinia minor)* (pp. 60-75). Bogotá, Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica).
- Moreno, C. A., Cotes, A. M., Smith, A., Beltrán, C., Villamizar, L., ... Santos, A. (2010b). *Desarrollo de un bioplaguicida a base de Trichoderma koningiiopsis Th003 y uso en el cultivo de lechuga para el control del moho blanco Sclerotinia sclerotiorum y Sclerotinia minor*. Bogotá, Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica).
- Moreno, C. A., Cotes, A. M., & Vergara, E. G. (2007). Biological control of foliar diseases in tomato greenhouse crop in Colombia: selection of antagonists and efficacy tests. *IOBC WPRS Bulletin*, 30, 59.
- Moretto, C., Cervantes, A. L. L., Batista, A., & Kupper, K. C. (2014). Integrated control of green mold to reduce chemical treatment in post-harvest citrus fruits. *Scientia Horticulturae*, 165, 433-438. doi:10.1016/j.scienta.2013.11.019.
- Morris, C., E., Monteil, C. L., & Berge, O. (2013). The life history of *Pseudomonas syringae*: Linking agriculture to earth system processes. *Annual Review*

- Phytopathology*, 51, 85-104. doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102402.
- Muccilli, S., & Restuccia, C. (2015). Bioprotective role of yeasts. *Microorganisms*, 3(4), 588-611. doi:10.3390/microorganisms3040588.
- Mukherjee, P., Sherkhane, P., & Murthy, N. (1999). Induction of stable benomyl-tolerant phenotypic mutants of *Trichoderma pseudokoningii* MTCC 3011, and their evaluation for antagonistic and biocontrol potential. *Indian Journal of Experimental Biology*, 37(7), 710-712.
- Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., & Kenerley, C. M. (2012). Secondary metabolism in *Trichoderma* – a genomic perspective. *Microbiology*, 158(1), 35-45. doi:10.1099/mic.0.053629-0.
- Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Singh, U. S., Mukherjee, M., & Schmoll, M. (2013). *Trichoderma* in agriculture, industry and medicine: an overview. En P. K. Mukherjee, U. S. Singh, B. A. Horwitz, M. Schmoll, & M. Mukherjee (Eds.), *Trichoderma biology and applications* (pp. 1-9). CAB International. doi:10.1079/9781780642475.0001.
- Murphy, J. F. (2006). Applied aspects of induced resistance to plant virus infection. En G. Loebeinstein & J. P. Carr (Eds.), *Natural resistance mechanisms of plants to viruses* (pp. 1-11). Dordrecht, Holanda: Springer. doi:10.1007/1-4020-3780-5_1.
- Murty, V. S. & Devadath, S. (1984). Role of seed in survival and transmission of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* causing bacterial Blight of rice. *Journal of Phytopathology*, 110(1), 15-19. doi:10.1111/j.1439-0434.1984.tb00735.x.
- Nakano, M. M. & Zuber, P. (1998). Anaerobic growth of a "Strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). *Annual Review of Microbiology*, 52, 165-190. doi:10.1146/annurev.micro.52.1.165.
- Nakazono-Nagaoka, E., Sato, C., Kosaka, Y., & Natsuaki, T. (2004). Evaluation of cross-protection with an attenuated isolate of Bean yellow mosaic virus by differential detection of virus isolates using RT-PCR. *Journal of General Plant Pathology*, 70(6), 359-362. doi:10.1007/s10327-004-0138-3.
- Narayanasamy, P. (2013). Mechanisms of action of fungal biological control agents. En P. Narayanasamy (Ed.), *Biological management of diseases of crops: Volume 1: Characteristics of biological control agents* (pp. 99-200). Dordrecht, Holanda: Springer. doi:10.1007/978-94-007-6380-7_3.
- Navazio, L., Baldan, B., Moscatiello, R., Zuppini, A., Woo, S. L., ... Lorito, M. (2007). Calcium-mediated perception and defense responses activated in plant cells by metabolite mixtures secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*. *BMC Plant Biology*, 7, 41. doi:10.1186/1471-2229-7-41.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2017). *Taxonomy browser*. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1883>.
- Nelson, M. E., & Powelson, M. L. (1998). Biological control of gray mold of snap beans by *Trichoderma hamatum*. *Plant Disease*, 72(8), 727-729. doi:10.1094/PD-72-0727.
- Newhook, F. J. (1951). Microbiological control of *Botrytis cinerea* pers. Ii. Antagonism by fungi and actinomycetes. *Annals of Applied Biology*, 38(1), 185-202. doi:10.1111/j.1744-7348.1951.tb07796.x.
- Niño-Liu, D. O., Ronald, P. C., & Bogdanove, A. J. (2006). *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. *Molecular Plant Pathology*, 7(5), 303-324. doi:10.1111/j.1364-3703.2006.00344.x.
- Nishiguchi, M., Kikuchi, S., Kiho, Y., Ohno, T., Meshi, T., & Okada, Y. (1985). Molecular basis of plant viral virulence; the complete nucleotide sequence of an attenuated strain of tobacco mosaic virus. *Nucleic Acids Research*, 13(15), 5585-5590. doi:10.1093/nar/13.15.5585.
- Nishiguchi, M., & Kobayashi, K. (2011). Attenuated plant viruses: preventing virus diseases and understanding the molecular mechanism. *Journal of General Plant Pathology*, 77(4), 221-229. doi:10.1007/s10327-011-0318-x.
- Noris, E., Accotto, G. P., Tavazza, R., Brunetti, A., Crespi, S., & Tavazza, M. (1996). Resistance to tomato yellow leaf curl geminivirus in *Nicotiana benthamiana* plants transformed with a truncated viral C1 gene. *Virology*, 224(1), 130-138. doi:10.1006/viro.1996.0514.
- O'Neill, T. M., Elad, Y., Shtienberg, D., & Cohen, A. (1996). Control of grapevine grey mould with *Trichoderma harzianum* T39. *Biocontrol Science and Technology*, 6(2), 139-146. doi:10.1080/09583159650039340.
- Orton, E. S., Deller, S., & Brown, J. K. M. (2011). *Mycosphaerella graminicola*: from genomics to disease control. *Molecular Plant Pathology*, 12(5), 413-424. doi:10.1111/j.1364-3703.2010.00688.x.
- Oshima, N. (1981). Control of tomato mosaic disease by attenuated virus. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 14(4), 222-228.
- Pal, K. K., & Gardener, B. M. (2006). Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*, 2, 1117-1142. doi:10.1094/PHI-A-2006-1117-02.

- Palaniyandi, S. A., Yang, S. H., Cheng, J. H., Meng, L., & Suh, J. W. (2011). Biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) in yam by *Streptomyces* sp. MJM5763. *Journal of Applied Microbiology*, 111(2), 443-455. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05048.x.
- Palmieri, M. C., Perazzolli, M., Matafora, V., Moretto, M., Bachi, A., & Pertot, I. (2012). Proteomic analysis of grapevine resistance induced by *Trichoderma harzianum* T39 reveals specific defence pathways activated against downy mildew. *Journal of Experimental Botany*, 63(17), 6237-6251. doi:10.1093/jxb/ers279.
- Parker, J. E., Schulte, W., Hahlbrock, K., & Scheel, D. (1991). An extracellular glycoprotein from *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* elicits phytoalexin synthesis in cultured parsley cells and protoplasts. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 4, 19-27.
- Patiño-Vera, M., Jiménez, B., Balderas, K., Ortiz, M., Allende, R., ... Galindo, E. (2005). Pilot-scale production and liquid formulation of *Rhodotorula minuta*, a potential biocontrol agent of mango anthracnose. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3), 540-550. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02646.x.
- Paulitz, T. C., & Bélanger, R. R. (2001). Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology*, 39, 103-133. doi:10.1146/annurev.phyto.39.1.103.
- Pearson, M. N., & Bailey, A. M. (2013). Viruses of *Botrytis*. *Advances in Virus Research*, 86, 249-272. doi:10.1016/B978-0-12-394315-6.00009-X.
- Peng, G., & Sutton, J. C. (1991). Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 13(3), 247-257. doi:10.1080/07060669109500938.
- Peng, G., Sutton, J. C., & Kevan, P. G. (1992). Effectiveness of honey bees for applying the biocontrol agent *Gliocladium roseum* to strawberry flowers to suppress *Botrytis cinerea*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 14(2), 117-129. doi:10.1080/07060669209500888.
- Peñuelas, J., & Terradas, J. (2014). The foliar microbiome. *Trends Plant Science*, 19(5), 278-280. doi:10.1016/j.tplants.2013.12.007.
- Perazzolli, M., Dagostin, S., Ferrari, A., Elad, Y., & Pertot, I. (2008). Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole. *Biological Control*, 47(2), 228-234. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.08.008.
- Perazzolli, M., Moretto, M., Fontana, P., Ferrarini, A., Velasco, R., ... Pertot, I. (2012). Downy mildew resistance induced by *Trichoderma harzianum* T39 in susceptible grapevines partially mimics transcriptional changes of resistant genotypes. *BMC Genomics*, 13, 660. doi:10.1186/1471-2164-13-660.
- 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.
- Perelló, A., & Mónaco, C. (2007). Reseña de "status and progress of biological control of wheat (*Triticum aestivum* L.) foliar diseases in argentina". *Fitosanidad*, 11(2), 85-105.
- Perlak, F., Kaniewski, W., Lawson, C., Vincent, M., & Feldman, J. (1994). Genetically improved potatoes: Their potential role in integrated pest management. En M. Manka (Ed.), *3th Conference of the European Foundation for Plant Pathology (EFPP)* (pp. 451-454). Wageningen, Holanda: EFPP.
- Phillips, M. W. A., & McDougall, J. (2012). Crop protection market trends and opportunities for new active ingredients. En American Chemical Society, *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* (p. 244). Washington, EE. UU.: American Chemical Society.
- Piggot, P. J., & Hilbert, D. W. (2004). Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, 7(6), 579-586. doi:10.1016/j.mib.2004.10.001.
- Pintye, A., Bereczky, Z., Kovács, G. M., Nagy, L. G., Xu, X., ... Kiss, L. (2012). No indication of strict host associations in a widespread mycoparasite: Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*) is attacked by phylogenetically distant ampelomyces strains in the field. *Phytopathology*, 102(7), 707-716. doi:10.1094/PHYTO-10-11-0270.
- Prabhakaran, N., Prameeladevi, T., Sathiyabama, M., & Kamil, D. (2015). Screening of different *Trichoderma* species against agriculturally important foliar plant pathogens. *Journal of Environmental Biology*, 36(1), 191.
- Prins, M., Laimer, M., Noris, E., Schubert, J., Wassenegger, M., & Tepfer, M. (2008). Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Molecular Plant Pathology*, 9(1), 73-83. doi:10.1111/j.1364-3703.2007.00447.x.
- Prusky, D. (1996). Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 34(1), 413-434. doi:10.1146/annurev.phyto.34.1.413.

- Punja, Z. K., & Utkhede, R. S. (2003). Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends Biotechnology*, 21(9), 400-407. doi:10.1016/S0167-7799(03)00193-8.
- Pusey, P. L., Stockwell, V. O., & Mazzola, M. (2009). Epiphytic bacteria and yeasts on apple blossoms and their potential as antagonists of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 99(5), 571-581. doi:10.1094/PHYTO-99-5-0571.
- Rabindran, R., & Vidhyasekaran, P. (1996). Development of a formulation of *Pseudomonas fluorescens* PfALR2 for management of rice sheath blight. *Crop Protection*, 15(8), 715-721. doi:10.1016/S0261-2194(96)00045-2.
- Ramarathnam, R., Fernando, W. G. D., & de Kievit, T. (2011). The role of antibiosis and induced systemic resistance, mediated by strains of *Pseudomonas chlororaphis*, *Bacillus cereus* and *B. amyloliquefaciens*, in controlling blackleg disease of canola. *BioControl*, 56(2), 225-235. doi:10.1007/s10526-010-9324-8.
- Ramesh, S., & Mathivanan, N. (2009). Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(12), 2103-2111. doi:10.1007/s11274-009-0113-4.
- Redford, A. J., & Fierer, N. (2009). Bacterial succession on the leaf surface: A novel system for studying successional dynamics. *Microbial Ecology*, 58(1), 189-198. doi:10.1007/s00248-009-9495-y.
- Redmond, J., Marois, J., & MacDonald, J. (1987). Biological control of *Botrytis cinerea* on roses with epiphytic microorganisms. *Plant Disease*, 71(9), 799-802. doi:10.1094/PD-71-0799.
- Robiglio, A., Sosa, M. C., Lutz, M. C., Lopes, C. A., & Sangorrín, M. P. (2011). Yeast biocontrol of fungal spoilage of pears stored at low temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 147(3), 211-216. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.007.
- Rodríguez-Palenzuela, P., Matas, I. M., Murillo, J., López-Solanilla, E., Bardaji, L., Pérez-Martínez, I., ... Ramos, C. (2010). Annotation and overview of the *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 draft genome reveals the virulence gene complement of a tumour-inducing pathogen of woody hosts. *Environmental Microbiology*, 12(6), 1604-1620. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02207.x.
- Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R. H., Dufour, S. E., Veening, J. W., ... Pérez-García, A. (2007a). The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podospaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 20(4), 430-440. doi:10.1094/mpmi-20-4-0430.
- Romero, D., De Vicente, A., Zeriouh, H., Cazorla, F. M., Fernández-Ortuño, D., ... Pérez-García, A. (2007b). Evaluation of biological control agents for managing cucurbit powdery mildew on greenhouse-grown melon. *Plant Pathology*, 56(6), 976-986. doi:10.1111/j.1365-3059.2007.01684.x.
- Romero, D., Rivera, M. E., Cazorla, F. M., De Vicente, A., & Pérez-García, A. (2003). Effect of mycoparasitic fungi on the development of *Sphaerotheca fusca* in melon leaves. *Mycological Research*, 107(1), 64-71. doi:10.1017/S0953756202006974.
- Roossinck, M. J., Sleat, D., & Palukaitis, P. (1992). Satellite RNAs of plant viruses: structures and biological effects. *Microbiological Reviews*, 56(2), 265-279.
- Ruanjan, P., Kertbundit, S., & Juříček, M. (2007). Post-transcriptional gene silencing is involved in resistance of transgenic papayas to papaya ringspot virus. *Biologia Plantarum*, 51(3), 517-520. doi:10.1007/s10535-007-0110-0.
- Ruberson, J. R. (1999). *Handbook of pest management*. Nueva York, EE. UU.: CRC Press.
- Rückert, C., Blom, J., Chen, X., Reva, O., & Borriss, R. (2011). Genome sequence of *B. amyloliquefaciens* type strain DSM7T reveals differences to plant-associated *B. amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Biotechnology*, 155(1), 78-85. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.01.006
- Ruinen, J. (1956). Occurrence of *Beijerinckia* species in the "Phyllosphere". *Nature*, 177, 220-221. doi:10.1038/177220a0.
- Saha, D., Kumar, R., Ghosh, S., Kumari, M., & Saha, A. (2012). Control of foliar diseases of tea with *Xanthium strumarium* leaf extract. *Industrial crops and products*, 37(1), 376-382. doi:10.1016/j.indcrop.2011.12.030.
- Saligkarias, I. D., Gravanis, F. T., & Epton, H. A. S. (2002). Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182: II. a study on mode of action. *Biological Control*, 25(2), 151-161. doi:10.1016/S1049-9644(02)00052-X.
- Samac, D. A., Willert, A. M., McBride, M. J., & Kinkel, L. L. (2003). Effects of antibiotic-producing *Streptomyces*

- on nodulation and leaf spot in alfalfa. *Applied Soil Ecology*, 22(1), 55-66. doi:10.1016/S0929-1393(02)00109-9.
- Samuels, G. J. (1996). *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycological Research*, 100(8), 923-935. doi:10.1016/S0953-7562(96)80043-8.
- Sanders, P. R., Sammons, B., Kaniewski, W., Haley, L., Layton, J., ... Tumer, N. (1992). Field resistance of transgenic tomatoes expressing the tobacco mosaic virus or tomato mosaic virus coat protein genes. *Phytopathology*, 82(6), 683-690. doi:10.1094/Phyto-82-683.
- Sansone, G., Rezza, I., Fernández, G., Calvente, V., Benuzzi, D., & Sanz, M. I. (2011). Inhibitors of polygalacturonase and laccase of *Botrytis cinerea* and their application to the control of this fungus. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65(1), 243-247. doi:10.1016/j.ibiod.2010.09.010.
- Saravanakumar, D., Spadaro, D., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2009). Detection of enzymatic activity and partial sequence of a chitinase gene in *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 used as post-harvest biocontrol agent. *European Journal of Plant Pathology*, 123(2), 183-193. doi:10.1007/s10658-008-9355-5.
- Sawant, I. S. (2014). *Trichoderma*-foliar pathogen interactions. *The Open Mycology Journal*, 8, 58-70. doi:10.2174/1874437001408010058.
- Sawant, I. S., Rajguru, Y. R., Salunkhe, V. P., & Wadkar, P. N. (2012). Evaluation and selection of efficient *Trichoderma* species and isolates from diverse locations in India for biological control of anthracnose disease of grapes. *Journal of Biological Control*, 26, 144-154.
- Sawant, I. S., Wadkar, P. N., Ghule, S. B., Rajguru, Y. R., Salunkhe, V. P., & Sawant, S. D. (2017). Enhanced biological control of powdery mildew in vineyards by integrating a strain of *Trichoderma afroharzianum* with sulphur. *Biological Control*, 114, 133-143. doi:10.1016/j.biocontrol.2017.08.011.
- Scarselletti, R., & Faull, J. L. (1994). *In vitro* activity of 6-pentyl- α -pyrone, a metabolite of *Trichoderma harzianum*, in the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Mycology Research*, 98(10), 1207-1209. doi:10.1016/S0953-7562(09)80206-2.
- Scherm, H., Ngugi, H. K., Savelle, A. T., & Edwards, J. R. (2004). Biological control of infection of blueberry flowers caused by *Monilinia vaccinii-corymbosi*. *Biological Control*, 29(2), 199-206. doi:10.1016/S1049-9644(03)00154-3.
- Schirmböck, M., Lorito, M., Wang, Y. L., Hayes, C. K., Arisan-Atac, I., ... Kubicek, C. P. (1994). Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(12), 4364-4370.
- Scholthof, K. B., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., ... Foster, G. D. (2011). Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 12(9), 938-954. doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x.
- Schoonbeek, H.-J., Jacquat-Bovet, A.-C., Mascher, F., & Métraux, J.-P. (2007). Oxalate-degrading bacteria can protect *Arabidopsis thaliana* and crop plants against *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(12), 1535-1544. doi:10.1094/MPMI-20-12-1535.
- Schuster, A., & Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied and Microbiological Biotechnology*, 87(3), 787-799. doi:10.1007/s00253-010-2632-1.
- Ser, H.-L., Law, J. W.-F., Chaiyakunapruk, N., Jacob, S. A., Palanisamy, U. D., ... Lee, L.-H. (2016). Fermentation conditions that affect clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: A systematic review. *Frontiers in Microbiology*, 7, 522. doi:10.3389/fmicb.2016.00522.
- Serrano, L., Manker, D., Brandi, F., & Cali, T. (2013). The use of *Bacillus subtilis* qst 713 and *Bacillus pumilus* qst 2808 as protectant fungicides in conventional application programs for black leaf streak control. *Acta Horticulturae*, 986. pp. 149-155. doi: 10.17660/ActaHortic.2013.986.15.
- Shade, A., Jacques, M. A., & Barret, M. (2017). Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Current Opinion in Microbiology*, 37, 15-22. doi:10.1016/j.mib.2017.03.010.
- Shafir, S., Dag, A., Bilu, A., Abu-Toamy, M., & Elad, Y. (2006). Honey bee dispersal of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* T39: effectiveness in suppressing *Botrytis cinerea* on strawberry under field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 116(2), 119-128. doi:10.1007/s10658-006-9047-y.

- Sharma, R. R., Singh, D., & Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, 50(3), 205-221. doi:10.1016/j.biocontrol.2009.05.001.
- Shigetou, N., Kaishu, L., Gonsalves, C., Gonsalves, D., & Slightom, J. L. (1991). Expression of the gene encoding the coat protein of cucumber mosaic virus (CMV) strain WL appears to provide protection to tobacco plants against infection by several different CMV strains. *Gene*, 107(2), 181-188. doi:10.1016/0378-1119(91)90317-5.
- 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.
- 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.
- Singh, D., Verma, N., & Varma, A. (2008). The fungal transmitted viruses. En A. Varma (Ed.), *Mycorrhiza: State of the art, genetics and molecular biology, eco-function, biotechnology, eco-physiology, structure and systematics* (pp. 485-503). Berlín, Alemania. Springer. doi:10.1007/978-3-540-78826-3_24.
- Sivasithamparam, K., & Ghisalberti, E. (1998). Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. En G. E. Harman & C. P. Kubicek (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium* (pp. 139-191). Londres, Reino Unido: Taylor & Francis Ltd.
- Smith, A., Beltrán, C. A., Kusunoki, M., Cotes, A. M., Motohashi, K., ... 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.
- Smits, T. H. M., Rezzonico, F., Kamber, T., Goesmann, A., Ishimaru, C. A., ... Duffy, B., (2010). Genome sequence of the biocontrol agent *Pantoea vagans* strain C9-1. *Journal of Bacteriology*, 192(24), 6486-6487. doi:10.1128/jb.01122-10.
- Sreenivasulu, C., & Aparna, Y. (2001). Bioremediation of methylparathion by free and immobilized cells of *Bacillus* sp. isolated from soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 67(1), 98-105. doi:10.1007/s001280096.
- Stefanova, M., Leiva, A., Larrinaga, L., & Coronado, M. (1999). Metabolic activity of *Trichoderma* spp. isolates for a control of soilborne phytopathogenic fungi. *Revista de la Facultad de Agronomía Universidad de Zulia*, 16, 509-516.
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4), 845-857. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x.
- Stirpe, F., Williams, D. G., Onyon, L. J., Legg, R. F., & Stevens, W. A. (1981). Dianthins, ribosome-damaging proteins with anti-viral properties from *Dianthus caryophyllus* L. (carnation). *The Biochemical Journal*, 195(2), 399-405.
- Sultan, M. (2012). *Biological control of leaf pathogens of tomato plants by Bacillus subtilis (strain FZB24): antagonistic effects and induced plant resistance*. Bonn, Alemania: University of Bonn.
- Sundheim, L., & Krekling, T. (1982). Host-parasite relationships of the hyperparasite *Ampelomyces quisqualis* and its powdery mildew host *Sphaerotheca fuliginea*. *Journal of Phytopathology*, 104(3), 202-210. doi:10.1111/j.1439-0434.1982.tb00527.x.
- Sutton, J., & Peng, G. (1993a). Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. *Phytopathology*, 83(6), 615-621. doi:10.1094/Phyto-83-615.
- Sutton, J. C., & Peng, G. (1993b). Manipulation and vectoring of biocontrol organisms to manage foliage and fruit diseases in cropping systems. *Annual Review of Phytopathology*, 31(1), 473-493. doi:10.1146/annurev.py.31.090193.002353.
- Swings, J., Van den Mooter, M., Vauterin, L., Hoste, B., Gillis, M., ... Kersters, K. (1990). Reclassification of the causal agents of bacterial blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) and bacterial leaf streak (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*) of rice as pathovars of *Xanthomonas oryzae* (ex ishiyama 1922) sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 40(3), 309-311. doi:10.1099/00207713-40-3-309.
- Szentiványi, O., & Kiss, L. (2003). Overwintering of *Ampelomyces mycoparasites* on apple trees and other plants infected with powdery mildews. *Plant Pathology*, 52(6), 737-746. doi:10.1111/j.1365-3059.2003.00937.x.
- Tahvonen, R., & Avikainen, H. (1987). The biological control of seed-borne *Alternaria brassicicola* of cruciferous plants with a powdery preparation

- of *Streptomyces* sp. *Journal of Agricultural Science in Finland*, 59, 199-208.
- Takamatsu, S. (2004). Phylogeny and evolution of the powdery mildew fungi (Erysiphales, Ascomycota) inferred from nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycoscience*, 45(2), 147-157. doi:10.1007/S10267-003-0159-3.
- Teng, P. (1994). Epidemiological basis for blast management. En R. S. Zeigler, S. A. Leong & P. S. Teng (Eds.), *Rice blast disease* (pp. 409-433). Wallingford, EE. UU.: CAB International.
- Thapa, S., Prasanna, R., Ranjan, K., Velmourougane, K., & Ramakrishnan, B. (2017). Nutrients and host attributes modulate the abundance and functional traits of phyllosphere microbiome in rice. *Microbiology Research*, 204, 55-64. doi:10.1016/j.micres.2017.07.007.
- Thresh, J. M., & Cooter, R. J. (2005). Strategies for controlling cassava mosaic virus disease in Africa. *Plant Pathology*, 54(5), 587-614. doi:10.1111/j.1365-3059.2005.01282.x.
- Torres, D. E., Rojas-Martínez, R. I., Zavaleta-Mejía, E., Guevara-Fefer, P., Márquez-Guzmán, G. J., & Pérez-Martínez, C. (2017). *Cladosporium cladosporioides* and *Cladosporium pseudocladosporioides* as potential new fungal antagonists of *Puccinia horiana* Henn., the causal agent of chrysanthemum white rust. *PLoS ONE*, 12(1), e0170782. doi:10.1371/journal.pone.0170782.
- Tronsmo, A., & Dennis, C. (1977). The use of *Trichoderma* species to control strawberry fruit rots. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 83, 449. doi:10.1007/bf03041462.
- Truchado, P., Gil, M. I., Reboleiro, P., Rodelas, B., & Allende, A. (2017). Impact of solar radiation exposure on phyllosphere bacterial community of red-pigmented baby leaf lettuce. *Food Microbiology*, 66, 77-85. doi:10.1016/j.fm.2017.03.018.
- Tsay, J. G., & Tung, B. (1991). *Ampelomyces quisqualis* ces. Ex schilecht., a hyper-parasite of the asparagus bean powdery mildew pathogen *Erysiphe polygoni* in Taiwan. *Transactions of the Mycological Society of Republic of China*, 6(2), 55-58. doi:10.7099/TMSRC.199106.0055.
- Tucker, S. L., & Talbot, N. J. (2001). Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 39, 385-417. doi:10.1146/annurev.phyto.39.1.385.
- Tuohimetsä, S., Hietaranta, T., Uosukainen, M., Kukkonen, S., & Karhu, S. (2014). Fruit development in artificially self- and cross-pollinated strawberries (*Fragaria × ananassa*) and raspberries (*Rubus idaeus*). *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*, 64(5), 408-415. doi:10.1080/09064710.2014.919348.
- Tuon, F. F., & Costa, S. F. (2008). *Rhodotorula* infection. A systematic review of 128 cases from literature. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(3), 135-140.
- Turnbull, P. C. (1996). *Bacillus*. En S. Baron (Ed.), *Barron's Medical Microbiology Medical Branch*. Texas, EE. UU.: University of Texas.
- Umesha, S., Dharmesh, S. M., Shetty, S. A., Krishnappa, M., & Shetty, H.S. (1998). Biocontrol of downy mildew disease of pearl millet using *Pseudomonas fluorescens*. *Crop Protection*, 17(5), 387-392. doi:10.1016/S0261-2194(98)00014-3.
- Urbasch, I. (1983). On the genesis and germination of chlamydospores of *Botrytis cinerea*. *Phytopathologische Zeitschrift*, 108(1), 54-60.
- Vali, G. (1995). Principles of ice nucleation. En R. E. Lee, G. J. Warren, L.V. Gusta (Eds.), *Biological ice nucleation and its applications* (pp. 1-28). Saint Paul, EE. UU.: The American Phytopathological Society (APS).
- 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 Damme, E. J. M., Barre, A., Barbieri, L., Valbonesi, P., Rouge, P., ... Peumans, W. J. (1997). Type 1 ribosome-inactivating proteins are the most abundant proteins in iris (*Iris hollandica* var. *Professor Blaauw*) bulbs: characterization and molecular cloning. *The Biochemical Journal*, 324(Pt. 3), 963.
- Van Kan, J. A. L., Shaw, M. W., & Grant-Downton, R. T. (2014). *Botrytis* species: relentless necrotrophic thugs or endophytes gone rogue? *Molecular Plant Pathology*, 15(9), 957-961. doi:10.1111/mpp.12148.
- Verdier, V., Restrepo, S., Mosquera, G., Jorge, V., & López, C. (2004). Recent progress in the characterization of molecular determinants in the *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*-cassava interaction. *Plant Molecular Biology*, 56(4), 573-584. doi:10.1007/s11103-004-5044-8.

- Verger, P. J. P., & Boobis, A. R. (2013). Reevaluate pesticides for food security and safety. *Science*, 341(6147), 717-718. doi:10.1126/science.1241572.
- Verma, H. N. (1994). Induction of durable resistance by primed *Clerodendrum aculeatum* leaf extract. *Indian Phytopathology*, 47(1), 19-22.
- Verma, H. N., & Awasthi, L. P. (1980). Occurrence of a highly antiviral agent in plants treated with *Boerhaavia diffusa* inhibitor. *Canadian Journal of Botany*, 58(20), 2141-2144. doi:10.1139/b80-246.
- Verma, H. N., & Dwivedi, S. D. (1984). Properties of a virus inhibiting agent, isolated from plants which have been treated with leaf extracts from *Bougainvillea spectabilis*. *Physiological Plant Pathology*, 25(1), 93-101. doi:10.1016/0048-4059(84)90020-1.
- Vidhyasekaran, P., Rabindran, R., Muthamilan, M., Nayar, K., Rajappan, K., ... Vasumathi, K. (1997). Development of a powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* for control of rice blast. *Plant Pathology*, 46(3), 291-297. doi:10.1046/j.1365-3059.1997.d01-27.x.
- Voegele, R. T., & Mendgen, K. W. (2011). Nutrient uptake in rust fungi: how sweet is parasitic life? *Euphytica*, 179(1), 41-55. doi:10.1007/s10681-011-0358-5.
- Völksch, B., & May, R. (2001). Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* by epiphytic bacteria under field conditions. *Microbial Ecology*, 41(2), 132-139. doi:10.1007/s002480000078.
- Vorholt, J. A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nature reviews. Microbiology*, 10(12), 828. doi:10.1038/nrmicro2910.
- Walker, A. S., Micoud, A., Rémuson, F., Grosman, J., Gredt, M., & Leroux, P. (2013). French vineyards provide information that opens ways for effective resistance management of *Botrytis cinerea* (grey mould). *Pest Management Science*, 69(6), 667-678. doi:10.1002/ps.3506.
- Wang, Q.-M., & Bai, F.-Y. (2004). Four new yeast species of the genus *Sporobolomyces* from plant leaves. *FEMS Yeast Research*, 4(6), 579-586. doi:10.1016/j.femsyr.2003.11.002.
- Wang, X., Xue, Y., Han, M., Bu, Y., & Liu, C. (2014). The ecological roles of *Bacillus thuringiensis* within phyllosphere environments. *Chemosphere*, 108, 258-264. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.01.050.
- Wasik, A. A., & Schiller, H. B. (2017). Functional proteomics of cellular mechanosensing mechanisms. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 71, 118-128. doi:10.1016/j.semcdb.2017.06.019.
- Wheeler, G. S., & Madeira, P. T. (2017). Phylogeny within the Anacardiaceae predicts host range of potential biological control agents of Brazilian peppertree. *Biological Control*, 108, 22-29. doi:10.1016/j.biocontrol.2017.01.017.
- Whipps, J. M., Hand, P., Pink, D., & Bending, G. D. (2008). Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *Journal of Applied Microbiology*, 105(6), 1744-1755. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03906.x.
- Whipps, J. M., McQuilken, M. P., & Budge, S. P. (1993). Use of fungal antagonists for biocontrol of damping-off and sclerotinia diseases. *Pestic Management Science*, 37(4), 309-313. doi:10.1002/ps.2780370402.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & Van Kan, J. A. L. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(5), 561-580. doi:10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x.
- Woo, S. L., Ruocco, M., Vinale, F., Nigro, M., Marra, R., ... Lorito, M. (2014). *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. *The Open Mycology Journal*, 8, 71-126. doi:10.2174/1874437001408010071.
- Wood, R. K. S. (1951). The control of diseases of lettuce by the use of antagonistic organisms I. The control of *Botrytis cinerea* pers. *Annals of Applied Biology*, 38(1), 203-216. doi:10.1111/j.1744-7348.1951.tb07797.x.
- Wu, M., Zhang, J., Yang, L., & Li, G. (2016). RNA mycoviruses and their role in *Botrytis* biology. En S. Fillinger & Y. Elad (Eds.), *Botrytis – the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems* (pp. 71-90). Cham, Alemania: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-23371-0_5.
- Wyand, R. A., & Brown, J. K. M. (2003). Genetic and forma specialis diversity in *Blumeria graminis* of cereals and its implications for host-pathogen co-evolution. *Molecular Plant Pathology*, 4(3), 187-198. doi:10.1046/j.1364-3703.2003.00167.x.
- Yang, C.-H., Crowley, D. E., Borneman, J., & Keen, N. T. (2001). Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(7), 3889-3894. doi:10.1073/pnas.051633898.
- Yang, H.-H., Yang, S. L., Peng, K.-C., Lo, C.-T., & Liu, S.-Y. (2009). Induced proteome of *Trichoderma harzianum* by *Botrytis cinerea*. *Mycological Research*, 113(Pt. 9), 924-932. doi:10.1016/j.mycres.2009.04.004.

- Yoshida, K., Goto, T., & Iizuka, N. (1985). Attenuated isolates of Cucumber Mosaic Virus produced by satellite RNA and cross protection between attenuated isolates and Virulent Ones. *Japanese Journal of Phytopathology*, 51(2), 238-242. doi:10.3186/jjphytopath.51.238.
- Yoshida, S., Hiradate, S., Koitabashi, M., Kamo, T., & Tsushima, S. (2017). Phyllosphere methylobacterium bacteria contain UVA-absorbing compounds. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology*, 167: 168-175. doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.12.019
- Young, C., & Andrews, J. (1990). Inhibition of pseudothecial development of *Venturia inaequalis* by the basidiomycete *Athelia bombacina* in apple leaf litter. *Phytopathology*, 80(6), 536-542. doi:10.1094/Phyto-80-536.
- Young, J. M., Bradbury, J. F., Davis, R. E., Dickey, R. S., Ercolani, G. L., ... Vidaver, A. K. (1991). Nomenclatural revisions of plant pathogenic bacteria and list of names 1980-1988. *Review of Plant Pathology*, 70(4), 211-221.
- Young, J. M., Park, D. C., Shearman, H. M., & Fargier, E. (2008). A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and Applied Microbiology*, 31(5), 366-377. doi:10.1016/j.syapm.2008.06.004.
- Zapata, J., Acosta, C., Díaz, A., Villamizar, L., & Cotes, A. (2011). Characterization of *Rhodotorula glutinis* and *Pichia onychis* Isolates with Potential as Biopesticides for Controlling *Botrytis cinerea*. *International Symposium on Biological Control of Postharvest Diseases: Challenges and Opportunities*, 905, 155-160. doi:10.17660/ActaHortic.2011.905.16.
- Zapata, J., Villamizar, L., Díaz, L., Uribe, L., Bolaños, C., ... Cotes, A. M. (2013a). Biological control of *Rhizoctonia solani* and growth promotion activity of *Trichoderma koningiopsis* Th003 and *Trichoderma asperellum* Th034 formulations in potato (*Solanum tuberosum*). *IOBC Bulletin*, 86, 223-227.
- Zapata, J., Villamizar, L., Díaz, L., Uribe, L., Bolaños, C., Gómez, M., & Cotes, A. M. (2013b). Development of a biopesticide prototype based on the yeast *Rhodotorula glutinis* Lv316 for controlling *Botrytis cinerea* in blackberry. *IOBC Bulletin*, 86, 263-269.
- Zapata, J. A., & Cotes, A. M. (2013). Eficacia de dos prototipos de bioplaguicida a base de *R. glutinis* cepa LvCo7 y un bioplaguicida a base de *T. koningiopsis*

- cepa Th003 en el control de *B. cinerea* en cultivos de mora. En J. Zapata, (Ed.), *LvCo7 para el control de Botrytis cinerea en cultivos de mora* (pp. 73-79). Mosquera, Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica).
- 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*. Leuven, Bélgica: International Society for Horticultural Science (ISHS).
- Zhan, G., Tian, Y., Wang, F., Chen, X., Guo, J., ... Kang, Z. (2014). A novel fungal hyperparasite of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, the causal agent of wheat stripe rust. *PLoS ONE*, 9(11), e111484. doi:10.1371/journal.pone.0111484.
- Zhang, B., Zhang, H., Jin, B., Tang, L., Yang, J., ... Bai, Z. (2008a). Effect of cypermethrin insecticide on the microbial community in cucumber phyllosphere. *Journal of Environmental Sciences*, 20(11), 1356-1362. doi:10.1016/S1001-0742(08)62233-0.
- Zhang, H., Ma, L., Jiang, S., Lin, H., Zhang, X., ... Xu, Z. (2010). Enhancement of biocontrol efficacy of *Rhodotorula glutinis* by salicylic acid against gray mold spoilage of strawberries. *International Journal of Food Microbiology*, 141(1-2), 122-125. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.022.
- Zhang, H., Ma, L., Wang, L., Jiang, S., Dong, Y., & Zheng, X. (2008b). Biocontrol of gray mold decay in peach fruit by integration of antagonistic yeast with salicylic acid and their effects on postharvest quality parameters. *Biological Control*, 47(1), 60-65. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.06.012.
- Zhang, H., Wang, L., Dong, Y., Jiang, S., Cao, J., & Meng, R. (2007). Postharvest biological control of gray mold decay of strawberry with *Rhodotorula glutinis*. *Biological Control*, 40(2), 287-292. doi:10.1016/j.biocontrol.2006.10.008.
- Zhang, H., Wang, L., Ma, L., Dong, Y., Jiang, S., ... Zheng, X. (2009). Biocontrol of major postharvest pathogens on apple using *Rhodotorula glutinis* and its effects on postharvest quality parameters. *Biological Control*, 48(1), 79-83. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.09.004.
- Zimand, G., Elad, Y., & Chet, I. (1996). Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Phytopathology*, 86(11), 1255-1260. doi:10.1094/Phyto-86-1255.