

SECCIÓN IX. BIOPLAGUICIDAS

CAPÍTULO 23: PLAGUICIDAS MICROBIALES: PROBLEMAS Y CONCEPTOS

HISTORIA DE LOS INSECTICIDAS MICROBIALES

El estudio de las enfermedades de los insectos empezó en el siglo XIX (Kirby y Spence, 1815) pero no en relación al control de insectos plaga sino para controlar enfermedades de especies comerciales, como el gusano de seda *Bombyx mori* (L.). Agostino Bassi fue el primero en demostrar experimentalmente la naturaleza infecciosa de la enfermedad de los insectos, en su estudio de 1835 sobre la enfermedad de la muscardina blanca de los gusanos de seda, causada por el hongo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. Louis Pasteur efectuó trabajos sobre otras enfermedades del gusano de seda en 1865-1870, en Francia. La primera sugerencia del uso de patógenos de insectos como insecticidas microbiales fue hecha en 1836 por Bassi, quien propuso que los cadáveres putrefactos de insectos muertos podrían ser mezclados con agua y ser rociados en el follaje para matar insectos. Las primeras pruebas de campo de este concepto fueron conducidas en 1884 por Elie Metchnikoff, quien produjo en masa conidias de *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin y las aplicó en pruebas de campo contra larvas del picudo de la remolacha *Cleonus punctiventris* (Germar), causando del 55-80% de mortalidad.

Los insecticidas microbiales más eficaces probaron ser los productos basados en la bacteria *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt), una especie descubierta primero en Japón por Ishiwata (1901). La historia de Bt, desde su descubrimiento inicial hasta el uso de los cultivos transgénicos que expresan toxinas Bt, fue resumida por Federici (2005). En síntesis, la bacteria fue nombrada en Alemania por Berliner (1915), después de su redescubrimiento allí como patógena de la polilla de la harina *Anagasta kuehniella* (Zeller). Investigadores franceses, como resultado de estudios de las enfermedades de las larvas del gusano de seda, desarrollaron el primer bioinsecticida basado en Bt (Sporeine) durante los 1930s (Jacobs, 1951). En los 1950s, investigaciones sobre Bt fueron iniciadas en California por E. A. Steinhaus. Un descubrimiento crítico temprano fue que el patógeno poseía cuerpos parasporales cristalinos que eran tóxicos para algunos insectos (Hannay, 1953). El aislamiento de muchas formas nuevas pero ligeramente diferentes del patógeno por varios investigadores ocurrió rápidamente y causó confusión hasta que Barjac y Bonnefoi (1962, 1968) desarrollaron un sistema de clasificación basado en antígenos flagelares. Más o menos al mismo tiempo, Dulmage (1981) y Burges establecieron estándares internacionales para los bioensayos con los nuevos aisla-

mientos y su comparación con la cepa estándar. Desde 1965 a 1981, el desarrollo comercial de productos Bt fue llevada a cabo por dos importantes compañías (Abbot Labs y Sandoz Corporation), las que desarrollaron productos como Dipel y Thuricide. Durante el mismo período, se descubrieron nuevas subespecies de Bt con actividad sobre otras plagas distintas a las larvas de Lepidoptera. Las nuevas subespecies más importantes fueron *Bt israelensis* (Goldberg y Margalit, 1977) con actividad contra larvas de moscas Nematocera (p. ej., zancudos y jejenes; van Essen y Hembree, 1980) y *Bt morrisoni* cepa *tenebrionis* (Krieg *et al.*, 1983) con actividad contra algunos escarabajos y larvas de crisomélidos, incluyendo al escarabajo de Colorado de la papa *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (ver revisiones de Entwistle *et al.*, 1993, y de Glare y O'Callaghan, 2000).

Bacillus thuringiensis mata a sus hospederos produciendo toxinas que se enlazan selectivamente con los sitios receptores en los microvilli del intestino medio. La muerte del insecto es causada por intoxicación, la que puede estar acompañada por la invasión del hemocele por células bacterianas vegetativas (Schnepf *et al.*, 1998). La forma más utilizada de Bt es el aislamiento HD1 de *Bt kurstaki*, el cual produce cuatro endotoxinas importantes, designadas como Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry 2Aa. Otra subespecie importante, *Bt israelensis*, produce Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa y la toxina Cyt1Aa, una toxina citolítica no relacionada con las proteínas Cry (Federici, 2007).

Después de 1981, las nuevas herramientas moleculares desarrolladas fueron aplicadas a este patógeno para crear cepas Bt modificadas genéticamente y, finalmente, cultivos Bt. El descubrimiento de que los genes de las toxinas Bt estaban localizados en plásmidos y no en el cromosoma Bt, permitió la clonación más fácil de los genes de la toxina (Schnepf y Whitely, 1981). Se desarrolló un esquema de clasificación para toxinas Bt (Hofte y Whitely, 1989), agrupándolas como toxinas cry (cristal) o cyt (citolíticas). Siguió estudios sobre la variación natural en las toxinas Bt, su modo de acción, especificidad y genes codificadores. Basada en estos avances, se usó la tecnología molecular para mejorar el Bt como bioplaguicida, primero creando cepas que combinaron toxinas de dos o más fuentes separadas. Esto fue seguido por la inserción de las toxinas más útiles dentro de plantas cultivadas (Fischhoff *et al.*, 1987, Perlak *et al.*, 1990, Koziel *et al.*, 1993), una actividad en la que la compañía Monsanto jugó el papel dominante. Un avance técnico crítico fue el crear cultivos Bt para incrementar la expresión Bt en plantas a niveles tóxicos para las plagas a controlar, lo que fue acompañado con la alteración de genes para optimizar su expresión (Perlak *et al.*, 1991). La seguridad de los cultivos Bt para otros organismos ha sido ampliamente demostrada (O'Callaghan *et al.*, 2005; Shelton *et al.*, 2002) y los cultivos Bt son usados ampliamente en los Estados Unidos y en muchos otros países. Para 2005, más del 50% del algodón y el 40% del maíz en los EU eran variedades Bt (Federici, 2005). Una consecuencia de tal adopción ha sido el fracaso de las compañías que buscaban promover el uso bioplaguicida de formulaciones Bt en estos mismos cultivos aunque su uso continúa en otros cultivos y para otras plagas como los zancudos.

El éxito de los productos de *B. thuringiensis* estimuló los esfuerzos comerciales con otros patógenos, incluyendo hongos y virus. Un directorio de los plaguicidas microbiales registrados actualmente en los países de la OCDE (la mayor parte de Europa, Estados Unidos, Canadá, Nueva Zelanda, Australia, Japón, Corea, México y Turquía) está disponible en www.agr.gc.ca/env/pdf/cat_e.pdf (Kabaluk y Gazdik, 2004). Para cada producto, esta lista indica el nombre del microbio, las plagas, los países donde está registrado, el fabricante y un enlace

web para mayor información sobre el producto. Sin embargo, los bioplaguicidas actualmente comprenden solamente cerca del 1% del mercado de los plaguicidas. De ellos, los productos Bt son el 80%.

¿QUÉ HACE DE UN PATÓGENO UN POSIBLE BIOPLAGUICIDA?

FACILIDAD Y COSTO DEL CULTIVO

Para tener oportunidad de tener éxito comercial como insecticida microbial, un patógeno debe ser fácil de producirse masivamente a bajo costo. El factor más importante que afecta el costo del cultivo es si se requieren hospederos vivos o no. *Bacillus thuringiensis*, el entomopatógeno más exitoso producido en volumen, puede ser cultivado en medios de fermentación (una mezcla sin vida de sustancias nutritivas). En contraste, *Paenibacillus* (antes *Bacillus*) *popilliae* (Dutky), un patógeno del escarabajo japonés (*Popillia japonica* Newman) que atrajo la atención por la importancia de la plaga en los Estados Unidos, requiere hospederos vivos para la producción de esporas. Esto incrementó dramáticamente los costos de producción y, junto con su alta especificidad, evitó que este patógeno se convirtiera en un éxito comercial importante. Otros aspectos de la producción, como la habilidad de un agente para crecer en medios líquidos o el desarrollo de métodos simples para la producción local por los agricultores en áreas rurales de países en desarrollo, también pueden afectar los costos. El costo de producción está en función de los costos de la mano de obra y de la tecnología, los cuales pueden cambiar. Los medios de cultivo que usan ingredientes baratos, como los cereales producidos localmente, pueden reducir el costo de producción (Hoti y Balaraman, 1990) pero los productos locales pueden carecer de la calidad alta y consistencia que los agricultores demandan.

GRADO DE ESPECIFICIDAD DE HOSPEDERO Y DE PATOGENICIDAD

Los patógenos que dan origen a plaguicidas microbiales efectivos son especies con un nivel razonable de especificidad y una alta actividad contra una o más plagas críticas de un cultivo importante, lo cual asegura un mercado de tamaño adecuado. La investigación en plaguicidas microbiales empezó con la búsqueda de productos de control de plagas que pudieran ser más compatibles con los enemigos naturales que los plaguicidas químicos. La alta especificidad fue valorada porque aseguraba que los patógenos afectarían solamente a las plagas a controlar y que entonces sería fácil integrarlos a los sistemas de manejo de plagas. Si la especificidad del hospedero es demasiado alta, el mercado puede ser demasiado pequeño para sostener la producción comercial, excepto cuando la plaga sea de gran importancia en un cultivo sembrado en áreas extensas. Por ejemplo, la mayoría de los baculovirus de insectos tienen rangos de hospederos limitados a unas pocas especies. Existen baculovirus con rangos más amplios, como la nucleopoliedrosis de *Autographa californica*, la cual ataca al menos a 43 especies en 11 familias de insectos (Payne, 1986). Sin embargo, este virus en particular es poco infeccioso, excepto en unas pocas larvas de polillas noctuidas.

En principio, la ingeniería genética puede ser usada para ampliar el espectro de hospederos de los patógenos. Por ejemplo, cepas de *B. thuringiensis* específicas para ciertos tipos de hospederos (la subespecie *kurstaki* para Lepidoptera, la subespecie *israelensis* para Diptera y la subespecie *tenebrionis* para Coleoptera) pueden ser manipuladas de manera que los rangos de hospederos de varias cepas sean combinados (Crickmore *et al.*, 1990; Gelernter, 1992) en un solo organismo. Aunque esto ya ha sido efectuado, ningún producto modificado ha tenido todavía un éxito dramático.

Existen patotipos dentro de la mayoría de las especies patógenas y éstos varían en la cantidad de material necesario para controlar a la plaga. Ya que los patógenos son relativamente caros, el uso de más patotipos virulentos reduce costos al disminuir la cantidad que debe ser aplicada. Los costos de producción de *B. thuringiensis* son comparables a los de los plaguicidas químicos modernos como el imidacloprid y el spinosad.

COMPATIBILIDAD DEL PATÓGENO CON EL SITIO DE APLICACIÓN PROPUESTO

Las condiciones físicas en el sitio de aplicación pueden afectar la eficacia de los entomopatógenos. En general, algunas de estas limitaciones son características de grupos completos: los nemátodos se secan fácilmente, los hongos necesitan condiciones húmedas para la germinación de las conidias, los virus son degradados en pocos días por la luz ultravioleta. Para ser apropiado para el uso propuesto, un patógeno debe ser tolerante a las condiciones encontradas comúnmente en los sitios de aplicación. Por ejemplo, los nemátodos son más adecuados para ser usados en ambientes húmedos como el suelo y dentro de tejidos vegetales, para el control de minadores de hojas o de barrenadores. También existe variación entre especies en grupos de patógenos que pueden afectar la conveniencia en sitios particulares de aplicación. El picudo negro *Otiiorhynchus sulcatus* (Fabricius) es una plaga importante en viveros de los Estados Unidos y Europa, y en algunas áreas de producción, las temperaturas del suelo son más bien bajas. Sin embargo, las especies de nemátodos que fueron comercializadas primero no fueron altamente efectivas en suelos fríos. *Heterorhabditis marelatus* (Liu & Berry, 1996), una especie descubierta después, es más efectiva a bajas temperaturas del suelo (Berry *et al.*, 1997).

RESUMEN DE LAS OPCIONES PARA CULTIVAR PATÓGENOS

Los patógenos pueden ser cultivados en hospederos vivos intactos (*in vivo*) o en medios de fermentación (*in vitro*), sin embargo, es poco común que la cría *in vivo* sea comercialmente práctica. Los virus también pueden ser cultivados en células vivas de insectos. Desde el principio, los patólogos han reconocido que la dependencia de los hospederos vivos limita la producción en gran escala. Algunos grupos de patógenos, sin embargo, son difíciles o imposibles de cultivar fuera de sus hospederos vivos. Esto incluye a los baculovirus, muchos hongos Entomophthoraceae, algunas bacterias y algunos nemátodos. Los patógenos que deben ser criados en hospederos vivos requieren de más mano de obra para su producción porque este proceso es difícil de automatizar y carece de economía de escala.

CRÍA EN HOSPEDEROS VIVOS

El proceso de cultivo en hospederos vivos (diferente de las líneas de células) requiere: (1) la cría masiva de un insecto hospedero, (2) pasos para infectar al hospedero y producir el patógeno, y (3) métodos de cosecha y procesamiento del patógeno. El paso uno empieza escogiendo un hospedero conveniente en el cual propagar al patógeno. Idealmente, debería ser la plaga a controlar pero puede no serlo, si esa especie es difícil de criar y el patógeno puede ser cultivado en otra especie que sea más conveniente. (Sin embargo, si el patógeno es producido en un hospedero alternante, hay un riesgo de adaptación al hospedero y de pérdida de infectividad en la plaga). La producción del hospedero de cría en plantas vivientes implica mayores costos y la presencia de otros organismos, por tanto, siempre que sea posible, conviene criar a los insectos hospederos en dieta artificial.

En el paso dos, la inoculación del hospedero y el crecimiento del patógeno empiezan tratando al hospedero con el estado infeccioso del patógeno, a menudo simplemente contaminando el alimento del hospedero. La meta es obtener el mayor rendimiento por hospedero, el que puede ser afectado por la dosis aplicada y por la edad del hospedero. Si es aplicada una concentración demasiado alta del patógeno o es aplicada muy pronto, los hospederos pueden morir jóvenes, logrando menos rendimiento.

El paso final, la cosecha y purificación del patógeno, debe ser barato y retener la viabilidad del patógeno. Dependiendo del patógeno, los cadáveres del hospedero pueden ser aspirados en vacío y secados (para los virus), lavados (para cosechar esporas de hongos) o (para nemátodos) colocados en arena húmeda para atrapar los nemátodos emergentes conforme salgan del hospedero y se dirijan al agua. Los patógenos cosechados entonces deben ser estabilizados en un medio de cultivo, a temperatura favorable para su sobrevivencia.

CRÍA EN MEDIOS DE FERMENTACIÓN O EN LÍNEAS DE CÉLULAS

Para los patógenos que no requieren organismos vivos, la producción puede ocurrir en medios de fermentación o en cultivos de células de insectos. Los medios de fermentación son usados para algunas bacterias y hongos. Dichos medios consisten de carbohidratos (como arroz o residuos de grano), proteínas, vitaminas, minerales, sales y antibióticos. Las mezclas exactas dependen del patógeno a cultivar y del costo y disponibilidad local de los materiales. Para bacterias, los medios de fermentación son líquidos, lo que les permite ser manipulados en tanques y bombas, logrando una economía de escala en la producción. Muchos hongos no producen conidias cuando están sumergidos. Por tanto, el cultivo de hongos requiere de un sistema en dos pasos, en el cual el micelio crece en cultivo líquido y después se coloca en medios sólidos para la producción de conidias. Alternativamente, los hongos podrían ser producidos usando las estructuras de unidades infecciosas que van a crecer en el líquido (fragmentos miceliales, blastosporas, esporas en descanso, clamidosporas). Este último enfoque usualmente requiere diferentes métodos de formulación para estabilizar al estado infectivo del patógeno para que retenga su viabilidad. Para los virus, los cultivos de células de insectos son un medio líquido que provee de células vivas para el ataque y la reproducción pero este sistema no es práctico para la producción de virus como bioplaguicidas. Los detalles de los sistemas de producción para los tipos de patógenos son discutidos en el Capítulo 24.

CALIDAD DEL AGENTE – ENCONTRARLO, CUIDARLO, MEJORARLO

INICIAR CULTIVOS CON AGENTES DE ALTA CALIDAD

El descubrimiento de nuevos agentes microbiales puede ser el resultado de la oportunidad, la revisión en laboratorio o de inspecciones de campo. Los descubrimientos de oportunidad de nuevos agentes útiles incluyen el hallazgo de *B. thuringiensis israelensis*, una subespecie patógena de zancudos, y del nemátodo *Steinernema riobrave* Cabanillas *et al.*, una especie efectiva contra pupas de *Heliothis zea* (Boddie) (Cabanillas y Raulston, 1994). Los programas de revisión también pueden ser usados para encontrar patógenos efectivos contra una plaga específica, examinando la actividad sobre la plaga de las colecciones de aislamientos existentes de un patógeno en laboratorios. Kawakami (1987), por ejemplo, investigó 61 aislamientos de *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch para conocer su patogenicidad contra *Psacothaea hilaris* (Pascoe), una plaga de la morera. Sin embargo, las inspecciones de campo son la fuente básica de nuevos aislamientos de patógenos. Los nuevos aislamientos efectivos contra una plaga específica pueden ser encontrados colectando grandes cantidades de la plaga en el campo, buscando los especímenes muertos o moribundos y examinándolos con técnicas de cultivo microbioal. Los postulados de Koch (aislar, infectar, reaislar) deben ser seguidos entonces para confirmar la patogenicidad. Pueden encontrarse nuevos patógenos generalistas con inspecciones de campo menos específicas. Las larvas de la polilla de la cera, por ejemplo, pueden ser colocadas en el suelo como cebos para encontrar nuevos nemátodos (p. ej., Deseo *et al.*, 1988; Hara *et al.*, 1991). Este enfoque puede ser usado para encontrar nemátodos u hongos preadaptados a condiciones particulares del suelo (caliente, frío, seco, húmedo, etc.).

RETENIENDO LA CALIDAD DEL AGENTE

Un cultivo de cría masiva de un patógeno puede contaminarse con otros microbios con el tiempo, pasando a ser menos productivo (en términos de la producción del patógeno/unidad del medio) o perder su virulencia hacia la plaga. En la producción comercial de patógenos, se requieren pruebas periódicas para detectar la contaminación, especialmente de patógenos de humanos (Jenkins y Grzywacz, 2000). Los cambios en el rendimiento pueden ser monitoreados contando el número de patógenos producidos por hospederos o por unidad del medio. La virulencia puede ser medida con bioensayos contra la plaga, comparando con una cepa estándar o con el aislamiento original del patógeno.

Los agentes microbiales pueden perder infectividad después de ser cultivados en medios artificiales por muchas generaciones. El cultivo repetido del hongo *Nomuraea rileyi* (Farlow) por transferencia de conidias condujo a la pérdida de su virulencia contra larvas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner en 16 generaciones. Sin embargo, la pérdida de virulencia fue asociada solamente con la propagación de las conidias ya que no se observó pérdida de virulencia de esta especie con hasta 80 pasos basados en transferencia de micelio (Morrow *et al.*, 1989). La atenuación que sigue a la propagación artificial prolongada ha sido observada en al menos otras siete especies de hongos (Hajek *et al.*, 1990b). Similarmente, los baculovirus producidos en hospederos alternantes pueden perder infectividad hacia el hospedero original, como ocurrió con el virus del gusano de seda (*B. mori*) al

ser cultivado por 18 generaciones en el barrenador asiático del arroz *Chilo suppressalis* (Walker) (Aizawa, 1987).

La pérdida de infectividad por el cultivo prolongado en medios de fermentación puede ser restablecida al reiniciar periódicamente el cultivo con patógenos de hospederos vivos o en un aislado infeccioso mantenido en almacenamiento a largo plazo. Este enfoque es usado para mantener la infectividad del nemátodo de los sirícidos *Deladenus (Beddingia) siricidicola* (Bedding), el que si es criado continuamente en su hongo hospedero, pierde la habilidad de infectar insectos. Tal pérdida de infectividad condujo a un fracaso mayor de un programa de control contra el sirícido *Sirex noctilio* (Fabricius) en bosques australianos durante los 1980s (Haugen, 1990). Esta situación fue resuelta colectando una raza virulenta del nemátodo en campo y usándola para la producción masiva. Para prevenir la reaparición de la atenuación, la producción de nemátodos usados para infectar en plantaciones nuevas de pinos se hace con material periódicamente renovado, a partir de un cultivo congelado de la raza infecciosa del nemátodo (Bedding, 1993).

Otro caso interesante sobre la retención de la calidad en un microbio producido como plaguicida, es el de *Serratia entomophila* Grimmont, Jackson, Ageron & Noonan. Este patógeno ha sido producido en Nueva Zelanda desde 1990 para el control de *Costelytra zealandica* (White), una plaga nativa de pastos (Jackson, 1994). Este patógeno fue afectado por dos problemas cuando fue producido masivamente. El primero fue una tendencia a los cultivos con cepas no virulentas. Se desarrolló un proceso de certificación de cultivos iniciales para asegurar que sólo se usaran células virulentas en los fermentadores comerciales. Este proceso se basó en la detección visual del plásmido específico en el cual se localizaban los genes para la virulencia. Esto fue confirmado después con ensayos de control de calidad, verificando que las larvas hubieran sido inoculadas con la cepa patogénica (Pearson y Jackson, 1995). El segundo problema en la cría de esta especie fue la contaminación de los fermentadores con virus que atacan bacterias (p. ej., fagos), los que pueden causar que la producción colapse. Este problema fue resuelto localizando una cepa mutante que no era atacada por el fago y que causaba la enfermedad en la plaga (Grkovic *et al.*, 1995).

MEJORAMIENTO GENÉTICO DE LOS PATÓGENOS

Los nemátodos y microbios potencialmente pueden ser mejorados en diversas características, tales como la tasa de infectividad en un hospedero dado, rango de hospederos, letalidad y resistencia a plaguicidas. También es posible mejorar características que afectan a la producción, como el rendimiento de esporas o la tasa de crecimiento bajo las condiciones de producción. Gaugler *et al.* (1989) usaron la selección de laboratorio para reforzar el hallazgo del hospedero de *Steinernema carpocapsae* (Weiser) en 20-27 veces. Algunos hongos entomopatógenos han sido modificados genéticamente para la resistencia a fungicidas (Goettel *et al.*, 1990). Se han modificado baculovirus para incrementar su velocidad para matar, insertando genes para producción de veneno (Bonning y Hammock, 1996; Cory, 2000).

MEDICIÓN DE LA EFICACIA DE LOS PLAGUICIDAS MICROBIALES

La eficacia es un problema crucial para los bioplaguicidas. Las pruebas para medir la eficacia son similares a las efectuadas para los plaguicidas químicos. Se aplican los productos cuando y donde se desean, y se miden los porcentajes de plagas muertas o los cambios en los números de plagas antes y después de la aplicación, comparados con un testigo sin tratamiento. Algunos hongos y nemátodos patógenos son aptos para “reciclarse” (reproducirse por varias generaciones) en los sitios de las aplicaciones. Las evaluaciones pueden tener varios objetivos, incluyendo: (1) la comparación de especies o cepas para identificar al mejor agente para una plaga en particular, (2) la comparación de diferentes formulaciones o métodos de aplicación, (3) la medición de la sensibilidad a la variación según los factores ambientales, o (4) la medición de la persistencia del patógeno después de la aplicación.

COMPARACIONES ENTRE AGENTES Y FORMULACIONES

Frecuentemente, varios patógenos pueden estar disponibles para controlar a la misma plaga. ¿Deberían los productores usar *Steinernema feltiae* (Filipjev) o *S. carpocapsae* para controlar micetofílicos en cultivos de flores en invernaderos? ¿Debería un productor forestal usar *B. thuringiensis* o baculovirus Gypchek® para controlar larvas de la polilla gitana? Las respuestas a tales preguntas provienen de las pruebas de campo, como las realizadas por Capinera *et al.* (1988) y Wright *et al.* (1988) para identificar la principal especie de nemátodo para las plagas de su interés. Dichas pruebas típicamente comparan aspectos como la variación en la dosis aplicada y en la formulación usada. Wright *et al.* (1988), por ejemplo, en sus pruebas para especies de nemátodos, consideraron las tasas de nemátodos con un rango de amplitud de ocho veces. Capinera *et al.* (1988) compararon tres métodos de aplicación de nemátodos para el control del gusano trozador: cápsulas de alginato de calcio, cebos con salvado de trigo y suspensiones acuosas.

El uso en el campo también requiere de algún conocimiento sobre qué tan a menudo debe ser aplicado el patógeno y cuál es el mejor tiempo para aplicar. Tatchell y Payne (1984), por ejemplo, encontraron variación en la edad de las larvas de *Pieris rapae* (L.) en campos de coles, por lo que las aplicaciones múltiples del virus dieron mejor control que una sola aplicación. En Kenia, las capturas de polillas en trampas con feromonas fueron usadas para hacer las aplicaciones de *B. thuringiensis* y controlar larvas neonatas de *Spodoptera exempta* (Walker) (Broza *et al.*, 1991). La integración de patógenos con plaguicidas puede ser explorada como un método para disminuir el uso de plaguicidas. Por ejemplo, las pruebas con dosis bajas de imidacloprid y nemátodos para el control de larvas de escarabajos demostraron que la combinación fue más efectiva que cada uno por separado (Koppenhöfer y Kaya, 1998).

EFFECTOS DE LOS FACTORES AMBIENTALES

En el campo, la eficacia del bioplaguicida estará afectada por factores que cambian su cubrimiento, la sobrevivencia del patógeno o la infectividad. La paja, por ejemplo, reduce la movilidad de los nemátodos aplicados en agua sobre el césped (Georgis, 1990),

reduciendo el número de nemátodos que alcanzan las larvas de escarabajos en la zona radicular. Los doseles densos o las hojas peludas pueden reducir las tasas de deposición de los productos sobre las hojas, reduciendo su efectividad. La sobrevivencia de muchos tipos de agentes microbiales es reducida por la luz ultravioleta o la resequeidad excesiva. En una prueba de campo en el Reino Unido, más de dos tercios de los granulovirus aplicados en repollos contra *P. rapae* fueron desactivados en un solo día (Tatchell y Payne, 1984). El grado en que los patógenos que contactan hospederos tienen éxito en infectarlos, dependerá del agente aplicado, la formulación y las condiciones físicas al tiempo de la aplicación. Muchos hongos, por ejemplo, deben tener alta humedad por un período crítico después de que las esporas llegan al hospedero para que las conidias germinen y penetren el integumento (Connick *et al.*, 1990). Ya que el clima es una cuestión local, las pruebas de campo deben ser efectuadas donde la plaga va a ser controlada.

PERSISTENCIA DEL IMPACTO DEL AGENTE DEBIDO A SU REPRODUCCIÓN

La mayoría de los insecticidas microbiales se degradan rápidamente después de la aplicación pero algunos son capaces de reproducirse bajo condiciones de campo. Por ejemplo, Allard *et al.* (1990) encontraron que la infección por el hongo *M. anisopliae* en el saltahoja sapo de la caña de azúcar *Aeneolamia varia* Fabricius var. *saccharina*, permaneció más alta en las parcelas tratadas que en el testigo por seis meses, después de una sola aplicación. En caña de azúcar en Australia, una sola aplicación del mismo hongo logró niveles comerciales de control de la plaga *Antitroglus* sp., por más de 30 meses (Samuels *et al.*, 1990). *Beauveria brongnartii* aplicada al suelo en Suiza para controlar al escarabajo *Melolontha melolontha* L., persiste en los suelos por varios años si las larvas están presentes (Kessler *et al.*, 2004). Jackson y Wouts (1987) encontraron que el grado de control del escarabajo del pasto *C. zealandica*, logrado por aplicaciones del nemátodo *Heterorhabditis* sp. en Nueva Zelanda, se incrementó desde 9 hasta 56% en un período de 18 meses, indicando un incremento de los nemátodos en el sitio debido a su reproducción. Un análisis económico en Tasmania del control de la plaga de los pastos *Adoryphorus coultoni* (Burmeister) demostró que un solo tratamiento con *M. anisopliae* persistió por 5-10 años, lo que hizo económico su uso comercial al ser comparado con el costo de renovación del pasto dañado por los insectos o por el uso del control químico (Rath *et al.*, 1990).

GRADO DE PENETRACIÓN EN EL MERCADO Y POSIBILIDADES FUTURAS

Muchos factores afectan el potencial de mercado de los patógenos como insecticidas microbiales en relación al grado en el que controlan a sus hospederos. El beneficio económico potencial de un posible producto y la extensión de los subsidios públicos, influyen en cuánto esfuerzo de investigación es dedicado al desarrollo de un patógeno como bioplaguicida. El potencial de ventas está influenciado por las opciones competitivas en el tiempo, específicamente si otras opciones están disponibles para la misma tarea. Además, los factores legales afectan la economía de los bioplaguicidas en desarrollo, especialmente los costos de registro del producto y la extensión de la protección a la patente. La influencia de tales fuerzas en el desarrollo del producto es ilustrada por Huber (1990), quien hizo un recuento de

las peripecias entre el descubrimiento en 1963, en México, de un granulovirus de la polilla de la manzana *Cydia pomonella* (L.) y de su mercadeo décadas después en Alemania como Granupom®. En algunos casos, la producción local de plaguicidas microbiales puede ayudar a incrementar su uso, reduciendo costos y la necesidad de divisas extranjeras (Bhumiratana, 1990). El desarrollo de un programa local para criar el virus de *Anticarsia gemmatalis* en Brasil, aumentó la soya tratada con este virus desde 2,000 ha en 1982-1983 hasta más de 1,000,000 ha en 1989-1990 (Moscardi, 1990); sin embargo, este programa recibió extensos subsidios gubernamentales.

TIPOS Y NÚMEROS DE PRODUCTOS REGISTRADOS

En 2004, 117 productos que representan a 20 patógenos (especies o cepas) estaban registrados en uno o más países de la OCDE (un consorcio de unos 40 países) (Tabla 23-1). Los productos registrados contenían dos bacterias (*P. popillia* y *B. thuringiensis*,

Tabla 23-1. Patógenos registrados como insecticidas (datos de Kabaluk y Gazdik, 2004)

Especies de microbios	Plagas controladas
Bacterias	
1. <i>Paenibacillus popilliae</i>	Larvas del escarabajo Japonés
2. <i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i>	Larvas de Lepidoptera
3. <i>B. thuringiensis israelensis</i>	Larvas de Diptera
4. <i>B. thuringiensis tenebrionis</i>	Larvas de Coleoptera
5. <i>B. thuringiensis aizawai</i>	Larvas de Lepidoptera
Hongos	
6. <i>Beauveria bassiana</i>	Moscas blancas, áfidos y otras
7. <i>Beauveria brongnartii</i>	Larvas de algunos escarabajos
8. <i>Lecanicillium muscarium</i> (Petch) Zare & W. Gams (antes <i>Verticillium lecanii</i>)	Áfidos y trips
9. <i>Lagenidium giganteum</i>	Larvas de zancudos
10. <i>Metarhizium anisopliae</i> cepa ESF1	Cucarachas y moscas
11. <i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Moscas blancas
Virus	
12. granulovirus	Enrollador de hojas
13. granulovirus	Polilla de la manzana
14. granulovirus	Polilla India de la harina
17. NPV de <i>Autographica californica</i>	Larvas de Lepidoptera
18. NPV de <i>Anagrapha falcifera</i>	Larvas de Lepidoptera
18. NPV de la palomilla del abeto Douglas	Larvas de la polilla del abeto Douglas
19. NPV de <i>Spodoptera exigua</i>	Larvas de Lepidoptera

incluyendo cuatro subespecies: *Bt azawi*, *Bt israelensis*, *Bt kurstaki* y *Bt tenebrionis*), seis hongos (*B. bassiana*, *B. brongniartii*, *Lecanicillium muscarium* (Petch) Zare & W. Gams (antes *Verticillium lecanii*), *Lagenidium giganteum* Couch, *M. anisopliae* y *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith) y siete baculovirus (tres granulovirus y cuatro nucleopoliedrovirus). Sin embargo, un solo agente (*Bt kurstaki*) representaba 57 de los 117 productos (Kabaluk y Gazdik, 2004).

TAMAÑO DEL MERCADO

En ausencia de subsidios gubernamentales, el factor más grande que influye en el desarrollo de un patógeno como plaguicida microbial, es su potencial de ventas. Para los agentes altamente específicos, el desarrollo comercial es sólo posible para los patógenos que matan plagas clave de cultivos sembrados en grandes extensiones como el algodón, el maíz y la soya (Huber, 1986) o en plagas forestales ampliamente distribuidas. No es probable que existan plaguicidas microbiales para plagas en cultivos especiales en pequeñas extensiones, a menos que el patógeno ya sea producido para otro mercado más grande. El uso de *B. thuringiensis israelensis* para el control de moscas en champiñones y plantas de aguas residuales, por ejemplo, es posible solamente porque este agente ya está siendo producido para el control de zancudos. Los productos para usos del sector público, como los utilizados para el control de defoliadores de bosques públicos, pueden ser viables si se usan fondos públicos para efectuar su desarrollo, registro y producción (Morris, 1981). Este enfoque ha sido sugerido por los forestales canadienses, quienes propusieron que las agencias del gobierno produzcan varios baculovirus de plagas clave y hacerlos disponibles al costo a los manejadores regionales de bosques, cuando ocurran explosiones de población de las plagas.

COMPETENCIA CON LOS PLAGUICIDAS

Los productos microbiales deben competir con los plaguicidas químicos existentes para compartir el mercado. Las oportunidades para hacerlo pueden existir cuando: un compuesto químico es prohibido por el gobierno, hay compuestos químicos que fallan debido a la resistencia, un plaguicida microbial es altamente efectivo y más barato que los químicos existentes o cuando hay problemas causados por los plaguicidas, como las explosiones de población de plagas secundarias que se vuelvan severas en un cultivo.

Para promover el uso de los bioplaguicidas, la variabilidad del control con plaguicidas microbiales debería ser minimizada con la investigación de los factores que afectan su eficacia, ajustando la formulación o las instrucciones de uso, conforme se necesite. En segundo lugar, los extensionistas deben educar a los productores a entender que ni los niveles de muerte extremadamente altos ni la muerte rápida son realmente necesarios para el control efectivo de plagas en la mayoría de los cultivos. Los esfuerzos educativos deberían enfatizar que los plaguicidas microbiales a menudo causan el cese rápido de la alimentación de la plaga y la reducción a largo plazo de sus tasas reproductivas. Los niveles moderadamente sostenidos de mortalidad por plaguicidas microbiales combinan bien con la conservación de parasitoides y depredadores, dejando algunas plagas que sirvan como

hospederos o presas. Sin embargo, la adopción de los bioplaguicidas puede ser inhibida en los cultivos con muchas especies plaga porque el insecticida microbial puede matar sólo algunas especies. En tales casos, típicamente es más barato y más fácil para los agricultores usar un plaguicida químico que controle el complejo de plagas completo.

FACTORES LEGALES

Los costos del registro de productos para el control de plagas en el gobierno y la disponibilidad de la protección de patentes, afecta fuertemente la probabilidad de desarrollar plaguicidas microbiales, especialmente para los mercados más pequeños. El éxito relativo de los nemátodos como bioinsecticidas se debe, en parte, a la falta de necesidad de registro del producto con este grupo de organismos (Hominick y Reid, 1990) en la mayoría de los países. La protección con patentes está disponible para los virus y bacterias comercializados recientemente pero la mayoría de las especies en producción en realidad no están patentadas. La protección con patentes no está disponible para hongos ni para nemátodos. Las patentes pueden ser obtenidas para tecnología usada en la cría, formulación o aplicación de tales organismos, o en patrones nuevos de uso.