

## CAPÍTULO 24: USO DE PATÓGENOS DE ARTRÓPODOS COMO PLAGUICIDAS

Este capítulo presenta información sobre bacterias, hongos y nemátodos desde la perspectiva de su uso actual o potencial como bioplaguicidas. Solamente algunas especies en cada grupo tienen realmente ese potencial mientras que otras pueden ser importantes en el control natural o en el control biológico clásico.

### BACTERIAS COMO INSECTICIDAS

#### BIOLOGÍA DE LAS BACTERIAS

Las bacterias son organismos unicelulares que tienen paredes celulares rígidas. Pueden ser bastoncillos, esferas (cocos), espirales o sin forma fija. Las especies que causan enfermedades en los artrópodos son discutidas por Tanada y Kaya (1993). Las bacterias más patogénicas entran a sus artrópodos hospederos cuando ingieren alimento contaminado. Tales bacterias se multiplican en el tracto digestivo, produciendo enzimas (como la lecitinasa y las proteinasas) y toxinas, las que dañan las células del intestino medio y facilitan la invasión del hemocele. El curso exacto de los eventos que siguen a la infección varía con el tipo de bacterias. En general, después de que invaden el hemocele, se multiplican y matan al hospedero por septicemia, toxinas o por ambas causas. En muchos casos, antes de morir los hospederos pierden el apetito y dejan de alimentarse. Los hospederos enfermos pueden descargar heces aguadas o vomitar. Los insectos que mueren por bacterias a menudo se oscurecen y su cuerpo se torna flácido. Los tejidos pueden hacerse viscosos y tener olor pútrido. Las especies de *Photorhabdus* y *Xenorhabdus*, asociadas con nemátodos que atacan insectos, causan que los hospederos se tornen rojos u otros colores característicos y carecen de olor pútrido. En estos grupos, los cadáveres permanecen intactos, se secan y se endurecen. Algunas bacterias son transmitidas de padres a hijos dentro o sobre los huevos, como por ejemplo *Serratia marcescens* Bizio en la langosta café *Locustana pardalina* (Walker) (Prinsloo, 1960).

El hemocele, para muchos tipos de bacterias, es el sitio característico para la infección en los artrópodos. Existen varios mecanismos que permiten que las bacterias alcancen el hemocele. Algunas especies del género *Bacillus* producen proteínas cristalinas tóxicas que ayudan a las bacterias a penetrar las células epiteliales del intestino medio. La penetración

empieza con enlazar esas proteínas a receptores en las células del intestino medio del hospedero, seguida por la formación de canales selectivos de cationes. Estos procesos permiten la destrucción del potencial eléctrico transmembrana, con la subsecuente lisis osmótica y la muerte de las células del intestino medio (Aronson y Shai, 2001). Los modos de acción de las endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* Berliner en los insectos fueron revisados por Gill *et al.* (1992), Aronson y Shai (2001), y Butko (2003).

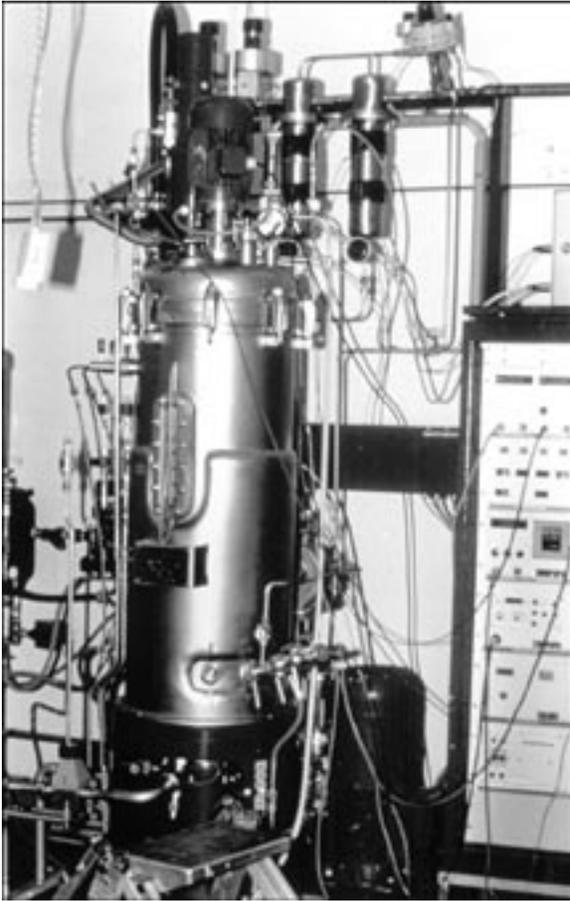
Muchos grupos de bacterias, sin embargo, carecen de tales toxinas y existen normalmente como saprofitos en el aparato digestivo de insectos o en otros habitats. Cuando el hospedero está estresado, estas bacterias (p. ej., *Proteus*, *Serratia*, *Pseudomonas* spp.) se multiplican más extensamente y es más probable que entren en el hemocele. Algunas bacterias patógenas especializadas de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, son simbioses que viven dentro de nemátodos patógenos de insectos. Estas bacterias pueden entrar al hemocele a través de la penetración física del insecto por su nemátodo (ver sección de nemátodos).

La especie de bacteria de mayor interés como insecticida microbial es *B. thuringiensis*, la cual produce toxinas que paralizan y después matan al hospedero invadido (Honée y Visser, 1993). Epizootias naturales de esta especie ocurren en los graneros y se cree que *B. thuringiensis* se desarrolló en asociación con insectos granívoros. Sin embargo, las aplicaciones de este patógeno no auto-perpetúan la epizootia, debido a la baja producción de esporas y a su transmisión horizontal ineficiente. Por tanto, los riesgos no deseados de las aplicaciones del Bt están limitados a los individuos en un taxón susceptible que realmente hagan contacto e ingieran el material aplicado (ver p. ej., Wagner *et al.*, 1996; Rastall *et al.*, 2003). Otras especies como *Paenibacillus* (antes *Bacillus*) *popilliae* (Dutky), son más efectivas en la transmisión horizontal y pueden mantener los ciclos de la enfermedad en poblaciones de artrópodos por años, bajo condiciones favorables.

## CRÍA MASIVA DE BACTERIAS

*Paenibacillus popilliae* es interesante porque ataca al escarabajo japonés, una plaga importante del césped y de plantas ornamentales. Sin embargo, no produce esporas cuando crece en medios artificiales (Stahly y Klein, 1992). Por tanto, células vegetativas del patógeno son cultivadas en medios artificiales o se colectan las esporas de larvas silvestres infectadas que deben ser inyectadas en el hemocele de una larva viva para producir esporas (Dulmage y Rhodes, 1971). Esto hace que el producto sea caro, inhibiendo su uso comercial a gran escala. En contraste, *B. thuringiensis* puede ser cultivada fácilmente en medios artificiales líquidos (**Figura 24-1**) que contengan harina de pescado, sólidos de maíz remojados en licor, melaza o harina de semilla de algodón. Las esporas bacterianas y las toxinas asociadas pueden ser recobradas por filtración, centrifugación o precipitación. La producción típicamente se hace en fermentadores de 40,000 a 120,000 litros, produciendo grandes cantidades (Federici, 2007).

Aunque es posible la producción de *B. thuringiensis israelensis* (Bti) (el cual infecta larvas de zancudos), en medios de fermentación, esta es relativamente costosa. Nuevos medios (Poopathi y Kumar, 2003; Prabakaran y Balaraman, 2006) han sido desarrollados para reducir significativamente el costo de producción, lo que haría económicamente vi-



**Figura 24-1.** La habilidad de producir *Bacillus thuringiensis* Berliner en medio líquido es la clave de su éxito comercial. Aquí se presenta un fermentador líquido en pequeña escala. La producción comercial se hace en tanques de hasta 120,000 litros. (Fotografía cortesía de D. Cooper; reimpressa de Van Driesche, R. G. y T. S. Bellows, *Biological Control*, 1996. Kluwer, con permiso.)

able el uso de *Bti* para control de zancudos en naciones en desarrollo, si se puede obtener una calidad consistente del producto.

## FORMULACIÓN DE INSECTICIDAS

### BACTERIANOS

La mayoría de los bioinsecticidas bacterianos contiene *B. thuringiensis*. Las formulaciones de *B. thuringiensis* deben ser ingeridas para ser efectivas, y la mayoría de los productos son dirigidos contra estados larvales. La mayoría de los productos Bt contienen esporas vivas y toxinas. Las esporas son relativamente estables, y son comercializadas como polvos humectables y como líquidos. La mayoría son formulados para ser aplicados como aspersiones acuosas al follaje. Algunas usan gránulos de almidón para encapsular las esporas y otros aditivos como adherentes, protectores de la luz ultravioleta o estimulantes de la alimentación. Las formulaciones de Bti para control de zancudos y jejenes son aplicadas como líquidos en habitats acuáticos (Mulla *et al.*, 1990) o como briquetas, las que pueden ser lanzadas en áreas de cría de zancudos. Los genes *B. thuringiensis* también han sido introducidos a cultivos importantes como algodónero y maíz, ocasionando la producción de toxinas en el follaje de las plantas, protegiéndolas de plagas filófagas (ver Capítulos 21 y 22).

### ALMACENAMIENTO DE INSECTICIDAS BACTERIANOS

Las esporas y toxinas de *Bacillus thuringiensis* son estables a temperatura ambiental y no requieren refrigeración (Glare y O'Callaghan, 2000), dando a este material propiedades de almacenamiento tan buenas como las de los plaguicidas químicos.

### LIMITACIONES AMBIENTALES DE LAS BACTERIAS

Los productos de *Bacillus thuringiensis* no son sensibles a la resequedad aunque la luz ultravioleta puede inactivar las esporas. Para la mayoría de los productos Bt, la eficacia disminuye unos pocos días después de la aplicación. Son venenos estomacales y solamente matan a las larvas de lepidópteros que realmente ingieren esporas o toxinas Bt, consumi-

endo el follaje tratado o a las larvas de mosquitos que ingieren esporas o toxinas adheridas a los alimentos filtrables en el agua.

## NIVEL DE EFICACIA Y ADOPCIÓN DE LOS INSECTICIDAS BACTERIANOS

Muchos científicos del control de plagas asumieron durante los 1980s e inicio de los 1990s que la ingeniería genética de las cepas de *B. thuringiensis* pronto conduciría a un amplio grupo de productos capaces de controlar numerosos tipos de plagas, pudiendo reemplazar a los plaguicidas en muchos usos. Esto no sucedió, en gran parte debido a que estos productos Bt controlaban plagas que finalmente fueron controladas por cultivos Bt. Estos se apoderaron de los principales mercados y condujeron al fracaso económico de las compañías con productos Bt. Como consecuencia, los productos de *B. thuringiensis* (distintos a las plantas Bt) han permanecido como una diminuta porción del mercado de insecticidas (<1%) que son usados principalmente en la protección integrada de cultivos en huertos (Figura 24-2), cultivos orgánicos y mercados pequeños, donde los plaguicidas convencionales son inaceptables.



**Figura 24-2.** Aplicación de *Bacillus thuringiensis* Berliner a un huerto de almendros para controlar al gusano de la naranja Navel *Amyelois transitella* (Walker). (Fotografía cortesía de P. V. Vail; reimpressa de Van Driesche, R. G. y T. S. Bellows, *Biological Control*, 1996. Kluwer, con permiso.)

Sin embargo, las plantas Bt son productos para el control de plagas primarias usados en casi la mitad del maíz y algodónero de los Estados Unidos. Otros usos a gran escala de productos Bt incluyen las aspersiones de lepidópteros plaga en bosques por agencias gubernamentales. En Canadá, el Bt ha reemplazado a los plaguicidas químicos para el control del gusano de la yema de la picea *Choristoneura fumiferana* (Clemens) como un método para reducir el daño a las aves del bosque. Otro uso principal de Bti ha sido un componente importante en la inmensamente exitosa campaña de salud pública, principalmente en África occidental, contra la enfermedad humana llamada ceguera de río. Esta enfermedad es causada por una filaria, cuyos vectores son los jejenes. Las aplicaciones de Bti en los sitios de cría de jejenes (principalmente ríos) como reemplazo de los plaguicidas químicos (después de que los insectos desarrollaron resistencia) fueron parte de un programa que rompió el ciclo de transmisión del patógeno, mejorando la salud de millones de personas (Kurtak *et al.*, 1989; Guillet *et al.*, 1990; Agoua *et al.*, 1991; Boatín y Richards, 2006).

## HONGOS COMO BIOPLAGUICIDAS

### BIOLOGÍA DE LOS HONGOS

Los organismos que muestran características de hongos son filogenéticamente diversos y, actualmente, son clasificados en dos reinos: Straminipila (antes Chromista) y Eumycota (hongos verdaderos). Los Straminipila incluyen a los patógenos de insectos en el grupo conocido como Oomycota (p. ej., *Lagenidium*) mientras que los Eumycota incluyen entomopatógenos en los Zygomycota (p. ej., *Entomophthora*, *Entomophaga*, *Neozygites*), Ascomycota (p. ej., *Cordyceps*) y Deuteromycota (p. ej., *Beauveria*, *Metarhizium*, *Lecanicillium*).

Morfológicamente, los hongos pueden ocurrir como células individuales (como las levaduras) o como filamentos ramificados (hifas) que forman marañas (micelio). Los hongos pueden reproducirse sexual o asexualmente o de ambas formas. La reproducción sexual involucra algún tipo de fusión entre dos estructuras como los gametos o las hifas. La espora conidial es el estado infectivo más comúnmente usado en los plaguicidas microbiales fungosos. Otras estructuras – fragmentos miceliales y blastoporos – han sido investigadas pero sin aplicaciones significativas. Los micoplaguicidas comerciales están basados principalmente en las conidias de los Deuteromycota. La entrada al hospedero usualmente es a través del integumento. La mayoría de los hongos no invaden hospederos a través del aparato digestivo aún si las conidias son ingeridas. El rango de hospederos de los hongos varía desde el estrecho (pocas especies) hasta el amplio pero algunas especies con rangos amplios pueden contener una serie de patotipos más específicos.

Las infecciones fungosas empiezan después de que las conidias u otros estados infecciosos hacen contacto al azar con un hospedero susceptible, al ser movidos por viento, lluvia o animales o, en el caso de los bioplaguicidas, por la aplicación directa a la plaga. Enseguida del contacto, debe ocurrir la adhesión y germinación de las conidias en la cutícula del hospedero. Las propiedades físicas y químicas de la cutícula del insecto afectan este proceso, influyendo en el rango de hospederos del hongo. La adhesión de las conidias a menudo es ayudada por materiales mucilaginosos. La conidia, después de ser depositada en la cutícula del hospedero y bajo humedad apropiada, produce un tubo germinal que abre brecha en el integumento del hospedero. La penetración de la hifa (tubo germinativo) ejerce presión física sobre un área parcialmente degradada por la liberación previa de enzimas digestivas sobre la cutícula. La cutícula completamente endurecida presenta una barrera mayor a la penetración fungosa que la cutícula nueva, haciendo que los insectos sean más susceptibles después de una muda.

Hay una gran variación en las infecciones fungosas pero la descripción siguiente es típica para zygomycetos y deuteromicetos. El hongo se reproduce rápidamente después de entrar a la cavidad del cuerpo de un insecto y mata al hospedero. Los hongos pueden crecer como hifas, cuerpos similares a levaduras y protoplastos sin paredes. Los protoplastos ayudan a vencer las defensas del hospedero porque no son reconocidos por el sistema inmune. Cuerpos similares a levaduras producen toxinas que ayudan a suprimir las reacciones inmunes. Después de que el hospedero muere, los hongos crecen como saprofitos

dentro el cadáver, formando un extenso micelio. Los conidióforos emergen del cadáver bajo condiciones apropiadas de humedad y temperatura, y producen conidias, las que son el estado típicamente cosechado de los micoplaguicidas. Las temperaturas de 20-30°C son más favorables para las infecciones fungosas. A menudo se requiere alta humedad (arriba de 90%) pero sin agua libre, para la germinación de conidias y para la producción conidial.

## CRÍA MASIVA DE HONGOS

Los micoplaguicidas son elaborados con especies que pueden crecer en medios sin vida. La mayoría de las especies deben ser producidas en medios sólidos, el hongo crece como maraña superficial y produce conidias en hifas aéreas. Alimentos naturales como el arroz o el salvado son medios de cultivo adecuados. Las conidias son cosechadas lavando los cultivos de hongos con agua destilada. El control efectivo con hongos de plagas típicamente requiere de  $10^5$  a  $10^6$  conidias/cm<sup>2</sup> de superficie foliar/ cm<sup>3</sup> de suelo. La producción de esta cantidad de conidias consume de 10-15 kg de sustrato de cultivo/ha (Federici, 2007), siendo costoso el tratamiento en áreas grandes de cultivos de campo (Feng *et al.*, 1994). Es posible que su uso sea más práctico en cultivos de alto valor, como las uvas orgánicas para vino en California, para el control de la chicharrita de alas cristalinas *Homalodisca coagulata* (Say), donde el valor de la producción/unidad de cultivo es muy alto (Federici, 2007).

La producción de hongos en medios sólidos carece de una economía a escala satisfactoria o del potencial para la automatización. Solamente pocas especies como *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin e *Hirsutella thompsonii* Fisher pueden esporular en cultivos sumergidos (Dulmage y Rhodes, 1971; van Winkelhoff y McCoy, 1984). Este problema puede ser parcialmente resuelto por un proceso de cultivo en dos pasos, en el que los cultivos sumergidos son usados primero para producir una gran cantidad de micelio, la cual es después colocada en medio sólido para obtener conidias (McCoy *et al.*, 1988).

Un método alternativo para la producción comercial de hongos entomopatógenos involucra productos basados en fragmentos miceliales o blastosporas, los cuales pueden ser producidos fácilmente en medio líquido. Este enfoque ha sido explorado con *H. thompsonii* y se ha desarrollado un proceso patentado en el que el micelio puede ser producido en cultivo sumergido, y después secado y almacenado en refrigeración hasta que vaya a ser aplicado (McCoy *et al.*, 1975; McCabe y Soper, 1985). Se han desarrollado medios nuevos para la producción de blastosporas de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith. Este sistema de producción presenta una serie de características favorables, incluyendo tiempos cortos de fermentación y altos rendimientos de blastosporas estables que permanecen viables e infecciosas después de secarse (Jackson *et al.*, 2003).

## FORMULACIONES DE HONGOS

Bateman (2004) discutió los factores tecnológicos que afectan el desarrollo de los micoplaguicidas. Las conidias fungosas necesitan contactar al integumento del hospedero para iniciar la infección. Los adhesivos que promuevan la adhesión de las conidias a la

plaga son, por tanto, posiblemente importantes componentes de muchos bioplaguicidas fungosos. Los agentes humectantes son usados comúnmente en plaguicidas para ayudar a dispersar el producto sobre el cuerpo de la plaga, reduciendo las interacciones electrostáticas que causan el agrupamiento. Sin embargo, los agentes humectantes pueden reducir la adherencia y la viabilidad de las conidias fungosas y deben ser probados para conocer su compatibilidad (Connick *et al.*, 1990). Nutrientes como la leche en polvo y la proteína seca de huevo pueden ser agregados a los micoplaguicidas para promover el crecimiento de hifas después de que germinen las conidias. Los suplementos nutricionales incrementan la infección, en algunos casos, (Curtis *et al.*, 2003) pero en otros la impiden, estimulando el crecimiento saprofito del hongo.

Pueden agregarse aceites vegetales o minerales a las formulaciones para conservar agua en las conidias, así como para promover una mejor germinación. Bateman *et al.* (1993) encontraron que, formulando *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal en aceite de semilla de algodón, redujeron la DL<sub>50</sub> del patógeno de la langosta del desierto *Schistocerca gregaria* Forskal en más del 99%. El desempeño de las formulaciones en aceites, comparadas con las acuosas, fue reforzado especialmente en ambientes áridos (con humedad relativa menor del 35%). Las pruebas de campo bajo condiciones áridas en Níger produjeron resultados satisfactorios (Bateman, 1992). La formulación de esporas fungosas en aceites también proporcionaron protección parcial contra la degradación por la luz ultravioleta (Moore *et al.*, 1993). La formulación de *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin en aceites vegetales, en dosis de 1/20 de sus dosis insecticidas, reforzó significativamente el control de la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) al mejorar la adherencia de las conidias, la distribución sobre las plagas y al proteger su viabilidad. Al agregar aceite aumentó la mortalidad de los insectos en un ensayo en laboratorio, del 25-30% hasta 94-98% (Malsam *et al.*, 2002).

Se han desarrollado formulaciones granulares de células vegetativas de hongos entomopatógenos como *M. anisopliae* (Storey *et al.*, 1990) y parecen ser promisorias para usarse contra gusanos cortadores y otros insectos que se alimentan en la superficie del suelo. Las formulaciones no granulares deben ser usadas para productos propuestos para enviar conidias fungosas a los insectos que se alimentan en el follaje. Algunas conidias germinan rápida y prematuramente en el agua, por lo que las formulaciones líquidas no son utilizables. En tales casos, deben usarse formulaciones en polvo o en polvo humectable.

## ALMACENAMIENTO DE HONGOS

Las propiedades de almacenamiento de los hongos usados para control de insectos varían, dependiendo de la especie y del estado infeccioso del hongo. Las conidias de especies como *B. bassiana* son estables y pueden ser almacenadas a temperatura ambiente. La formulación de conidias en aceite o queroseno mejoran la vida de anaquel del producto (Bateman, 1992; Bateman *et al.*, 1993). Las blastosporas de *Lecanicillium muscarium* (Petch) Zare & W. Gams (antes *Verticillium lecanii*) (Vertalec® y Mycotal®) deben ser almacenadas en refrigeración y son viables por varios meses (Bartlett y Jaronski, 1988). El patógeno, moho acuático del zancudo, *Lagenidium giganteum* Couch produce oosporas que pueden ser cosechadas y almacenadas en forma seca por muchos meses, produciendo

zoosporas infecciosas al humedecerse nuevamente (Lalgé *et al.*, 1986). Sin embargo, la producción de zoosporas por las oosporas es errática e inconsistente, haciendo difícil usar este moho acuoso como micoplaguicida.

### LIMITACIONES AMBIENTALES DEL USO DE PLAGUICIDAS FUNGOSOS

La limitación principal de la eficacia de los patógenos fungosos no es el rango de hospederos ya que muchas especies son polífagas sino más bien la falla de las conidias aplicadas para germinar e inducir un alto nivel de infección en los hospederos. En parte, éste es un problema de cubrimiento ya que suficientes conidias deben llegar e introducirse en la cutícula de cada hospedero. Pero, más fundamentalmente, es un problema de condiciones desfavorables para la germinación del hospedero. Aunque los requerimientos exactos para la germinación de conidias varían entre las especies y cepas de hongos entomopatógenos, muchas especies requieren alta humedad (>80%) por períodos relativamente largos (12-24 horas). Consecuentemente, los patógenos fungosos no trabajan muy bien en áreas que rutinariamente no tienen alta humedad.

### NIVEL DE EFICACIA Y ADOPCIÓN DE LOS PLAGUICIDAS FUNGOSOS

Los plaguicidas microbiales fungosos tienen un registro pobre de uso por los productores debido al costo/ha y a la variación en la eficacia del producto, por la poca infección bajo condiciones secas. Sólo unas pocas especies de hongos han sido registradas como plaguicidas, a pesar de la investigación sobre muchas especies. Seis hongos – *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *M. anisopliae*, *L. muscarium*, *P. fumosoroseus* y *L. giganteum* – han sido registrados para usarse en uno o más países de la OCDE como micoinsecticidas (**Tabla 23-1**).

Es más probable que los micoinsecticidas tengan éxito si se desarrollan como productos para mercados pequeños para resolver problemas específicos de plagas como *B. brongniartii* contra el escarabajo europeo *Melolontha melolontha* L. (Kessler *et al.*, 2004) o para el control de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en la producción de café orgánico (**Figura 24-3**) (Neves y Hirose, 2005), más bien que como plaguicidas de amplio espectro que compitan directamente con los plaguicidas establecidos en el mercado. El uso en cultivos de campo de bajo valor parece especialmente improbable, debido a las tasas de aplicación requeridas de  $10^{10}$ - $10^{14}$  conidias/acre (Federici, 1999). La capacidad actual de los sistemas de producción comercial no es adecuada para tratar áreas tan grandes como 20,000 ha/semana o mayores, lo que podría ser necesario para plagas de cultivos extensivos.

Otro modelo de negocios potencialmente viable para el desarrollo de insecticidas fungosos, es el trabajo a realizar por agencias públicas o con fondos públicos. El desarrollo de “Músculo Verde” por los investigadores del CABI con fondos de agencias donantes gubernamentales, fue un proyecto diseñado para encontrar productos fungosos para controlar las langostas migratorias en África y en otras áreas. La meta fue controlar una plaga agrícola transnacional importante y reemplazar a los plaguicidas dañinos con un material ambientalmente benigno. La gran área afectada por las langostas estimuló a las naciones donantes a proporcionar suficiente ayuda para sufragar la investigación y el desarrollo necesarios en varios tópicos, incluyendo la búsqueda inicial de especies y aislamientos



**Figura 24-3.** Aplicación del hongo *Beauveria bassiana* [Balsamo] Vuillemin al café para controlar la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari), en Colombia. (Fotografía cortesía de A. Bustillo.)

de hongos, el trabajo con formulaciones para la preservación de la viabilidad durante el almacenamiento y después de la aplicación, y las pruebas de campo de eficacia contra una variedad de especies de langostas en áreas con distintos climas. Se encontró que el hongo *M. anisopliae* var. *acridum* (antes *M. flavoviridae*) era una especie efectiva en pruebas de campo (Magalhães *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Kassa *et al.*, 2004) y que tiene buena propiedad de almacenamiento cuando se formula en mezclas de aceites vegetales y minerales (Bateman, 1992; Bateman *et al.*, 1993). La ayuda de los donantes para este trabajo llegó a su fin y cualquier desarrollo posterior o uso de estos productos mejorados depende ahora de los gobiernos nacionales.

## POTENCIAL DE LOS HONGOS FITOPATÓGENOS COMO BIOHERBICIDAS

La discusión anterior atañe a los hongos como entomopatógenos. Potencialmente, los hongos también podrían ser usados como bioherbicidas (ver Charudattan, 2001). La mayoría de los esfuerzos han sido basados en el uso de especies nativas del área donde se planean usar. Los métodos y problemas en la producción de hongos fitopatógenos son esencialmente los mismos que para los hongos entomopatógenos (Boyette *et al.*, 1991; Stowell, 1991). Sin embargo, el éxito comercial de dichos productos no ha sido logrado, en gran parte porque requieren almacenamiento especial, pueden ser difíciles de comprar y usar, pueden tener mercados limitados, o no ser competitivos con los herbicidas químicos.

Aunque hasta ocho micoherbicidas han logrado registrarse (Charudattan, 2001), pocos, si es que alguno, han tenido éxito comercialmente. El micoherbicida DeVine<sup>®</sup> fue comercializado para el control de la enredadera estranguladora *Morrenia odorata* Lindle en cítricos de Florida (EU). Este producto contenía clamidosporas del hongo *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler, formuladas en líquido concentrado. El material tenía que ser mantenido bajo refrigeración hasta ser aplicado y tenía una vida de almacenamiento de sólo seis semanas (Boyette *et al.*, 1991). Inicialmente, su uso comercial fue posible porque el producto fue comercializado en una pequeña región y para un grupo específico de usuarios (Kenney, 1986). Un segundo fitopatógeno, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penig) Saccardo & Penzig f. sp. *clidemiae*, fue comercializado en los EU como Collego<sup>®</sup> para el control de *Aeschynomene virginica* (L.) en arroz y en soya (Trujillo *et al.*, 1986; Templeton, 1992). Sin embargo, eventualmente los fabricantes de ambos productos abandonaron su producción por razones de negocios.

Otros dos hongos registrados para usarse como micoherbicidas todavía están disponibles. Smolder<sup>®</sup>, el cual contiene al hongo *Alternaria destruens* Simmons (Simmons, 1998), es comercializado para el control de la cúscuta parasítica *Cuscuta gronovii* Willd. ex J. A. Schultes en arándanos agrios (Bewick *et al.*, 1987; Hopen *et al.*, 1997). Además, *Chondrostereum purpureum* (Pers. ex Fr.) Pouzar se vende como BioChon<sup>®</sup> para el control de brotes en tocones de árboles de hoja ancha (de Jong, 2000; Conlin, 2002; Becker *et al.*, 2005). *Fusarium oxysporum* Schl. (“Foxy”) está siendo desarrollado para el control de las plantas parasíticas *Striga* en cultivos de grano (Elzein *et al.*, 2004).

## VIRUS COMO INSECTICIDAS

### BIOLOGÍA DE LOS VIRUS

Todos los virus se replican adentro de las células hospedadas, usando el metabolismo del hospedero para sintetizar proteínas y sus materiales (Matthews, 1991). Todos los virus usados como insecticidas microbiales son baculovirus. Los grupos contenidos en los baculovirus incluyen los nucleopoliedrovirus (NPV) y los granulovirus (GV). Estos virus del ADN son patógenos intracelulares obligados y atacan solamente artrópodos (Figura 24-4). Los baculovirus consisten de un genoma dentro de una *cápside* (cubierta protectora de proteínas) que juntos son llamados *nucleocápsido*. El nucleocápsido se convierte

en una partícula viral madura (llamada *virión*) después de ser cubierta con una envoltura lípida de dos capas. Los virus pueden encontrarse solamente con nucleocápsidos envueltos o cada nucleocápsido puede contener múltiples virus. Los viriones son después envueltos en una matriz protectora de proteínas para formar masas más grandes llamadas *cuerpos de oclusión*, los que son denominados *poliedros* para los NPVs y *gránulos* para los GVs. Los cuerpos de oclusión usualmente son de 2-4 micrones de diámetro y son visibles en un microscopio compuesto.

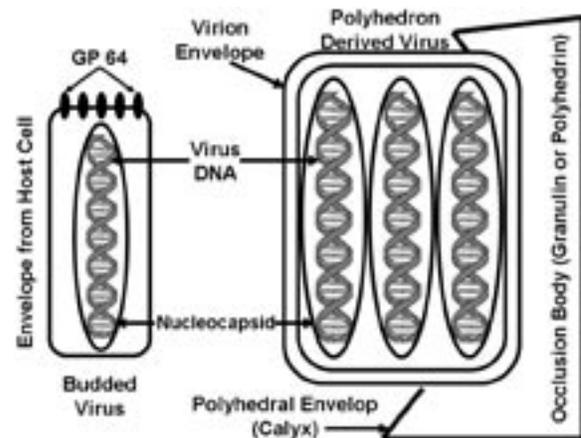


Figura 24-4. Diagrama de un baculovirus.

Los baculovirus entran a los hospederos cuando las larvas consumen alimento contaminado. El alto pH del intestino medio del insecto disuelve la proteína de los cuerpos de oclusión de los NPV, liberando viriones. Las cubiertas del virión se fusionan con las membranas celulares de los microvilli del intestino y los nucleocápsidos entran a las células hospederas. Los nucleocápsidos infectan el núcleo de la célula del intestino medio, el cual es el sitio primario de infección, donde ocurre la replicación viral y es producida la progenie del virión. Estos viriones adquieren una envoltura y entran al hemocele. Dicha progenie viral no está ocluida en las células del intestino medio de las larvas de Lepidoptera pero sí están ocluidas en las de moscas sierra (Hymenoptera).

En el hemocele, la infección es causada por una forma no ocluida de virus (llamada "virus con yemas"). Las larvas de Lepidoptera y las de moscas sierra (Hymenoptera) son los hospederos comunes de los baculovirus NPV. Después de la infección inicial en el intestino medio, los baculovirus ocasionan infecciones secundarias en muchos otros tejidos de las larvas de lepidópteros (cuerpo graso, hipodermis, tráquea, células sanguíneas) en la mayoría de los hospederos, y los viriones producidos en estos sitios secundarios están ocluidos con la matriz de proteína. En contraste, en las larvas de moscas sierra, los nucleopoliedrovirus infectan solamente el tejido del intestino medio y la progenie viral de este tejido está ocluida. Por tanto, las larvas de moscas sierra pueden arrojar viriones ocluidos en las heces, reforzando la transmisión a otras larvas de moscas sierra. Por su parte, las larvas de Lepidoptera solamente son infecciosas después de morir y los cadáveres en desintegración liberan viriones ocluidos.

Las larvas infectadas del hospedero continúan alimentándose pero a tasas menores, hasta unos pocos días antes de morir. Típicamente, los hospederos mueren de 5 a 21 días después de la infección, dependiendo de la especie hospedera. Algunas especies de larvas infectadas se mueven hacia arriba en la planta antes de morir, una conducta que facilita la transmisión horizontal de virus, a través de la contaminación del alimento. Los hospederos muertos normalmente quedan flácidos y el integumento se rompe, liberando cuerpos de oclusión con viriones, los que al caer contaminan el follaje inferior. El consumo de este follaje contaminado por nuevos hospederos completa el ciclo de transmisión. Si los hospederos son abundantes, puede haber epizootias.

La transmisión del virus de *Oryctes* (Un virus del ADN no ocluido y todavía no clasificado) en el escarabajo rinoceronte *Oryctes rhinoceros* (L.) es inusual porque los adultos son vectores del patógeno y lo transmiten a las larvas de la siguiente generación. La transmisión ocurre cuando las larvas contactan las heces de los adultos enfermos. Los adultos infectados pueden vivir hasta 30 días y las hembras diseminan el virus en sus heces cuando visitan los sitios comunales de oviposición en los tallos podridos de cocotero, donde se encuentran las larvas originadas de oviposiciones anteriores de otras hembras. El uso de este virus está basado en la inoculación de áreas locales y el control persiste por largos períodos (Jackson *et al.*, 2005).

## CULTIVO MASIVO DE VIRUS DE INSECTOS

Los virus, como patógenos obligados, sólo pueden desarrollarse en hospederos vivos ya sea en animales intactos o en cultivos de células vivas. Ver Ignoffo (1973) y Bell (1991) para las descripciones del cultivo masivo de NPV (**Figura 24-5a,b,c**). Las larvas hospederas son criadas en copas con dieta artificial y son infectadas rociando virus sobre la dieta, una semana después que los huevos del hospedero son agregados a las copas de dieta. Al final de la segunda semana, la mayoría de las larvas ya murieron. Los cadáveres se colectan, homogenizan, se cuelean a través de estopilla y se cosechan las partículas virales por centrifugación. Las tasas óptimas de inoculación viral pueden ser determinadas comparando campos de una serie de diferentes dosis virales por copa. Las dosis menores pueden no infectar a todas las larvas. Las dosis altas matan a las larvas todavía pequeñas, reduciendo el rendimiento de virus por larva. El costo de cultivar baculovirus ha sido calculado en dos centavos de dólar de EU (de 1991) por hospedero, 80% del cual es mano de obra. En Brasil, la producción en laboratorio fue reemplazada por el cultivo de virus en exteriores, en los que se localizan las explosiones naturales del hospedero, se infectan y se cosechan los insectos infectados después.

Los cultivos de células de insectos pueden ser usados para cultivar virus de insectos (Granados *et al.*, 1987; King *et al.*, 1988; Lynn *et al.*, 1990; Lenz *et al.*, 1991). El costo de producción es más alto que la cría *in vivo* y no es un método práctico de cultivo de estos virus para el control de plagas. Más bien, líneas de células son usadas principalmente para la industria farmacéutica para cultivar NPV genéticamente modificados para la producción de materiales de uso médico.



Figura 24-5a,b,c. La producción comercial de baculovirus comprende primero la cría masiva de un hospedero vivo adecuado (a), en este caso, el gusano de la yema de la picea *Choristoneura fumiferana* [Clemens]). Esto es seguido por la colecta de los cadáveres infectados con virus (b) y de la pulverización y liofilización de los cadáveres para producir una preparación viral estable. (Fotografía cortesía de J. C. Cunningham; reimpresa de Van Driesche, R. G. y T. S. Bellows, *Biological Control*, 1996. Kluwer, con permiso.)

## FORMULACIÓN DE VIRUS

Los filtrados simples de cadáveres aplastados, muertos por virus mezclados con agua, si son almacenados bajo refrigeración o congelados, usualmente funcionan tan bien o mejor que las formulaciones más complicadas. Sin embargo, tal enfoque simple no es útil para la producción de un producto de valor comercial, el cual debe poder ser almacenado hasta por seis meses y tener características físicas que permitan su aplicación con varios tipos de maquinaria. La formulación comercial de productos de baculovirus busca obtener material con propiedades físicas estables (no endurecidos o atascados) adecuados para la aplicación con maquinaria convencional para plaguicidas. Además, las formulaciones de productos comerciales a menudo incluyen materiales con funciones especiales como

dispersores, protectores contra luz ultravioleta, y productos de comida que permiten estimular el consumo por la plaga (Young y Yearian, 1986).

Varios métodos han sido usados para formular productos comerciales de baculovirus. El primero de ellos es el secado del virus por frío. El agrupamiento puede ser evitado mezclando primero los cadáveres hospederos con lactosa. Un segundo enfoque es mezclar arcilla attapulgita con el virus en suspensión acuosa que después se rocía y se permite que se seque. Este proceso produce un polvo humectable estable en el que el virus está microencapsulado en una cubierta de arcilla. Un tercer enfoque es microencapsular los cuerpos de inclusión virales con materiales como la metilcelulosa o la gelatina (Young y Yearian, 1986).

Los materiales que actúan como protectores de la luz ultravioleta incluyen una variedad de pigmentos, especialmente el rojo Congo (Shapiro y Robertson, 1990), la encapsulación en almidón (Ignoffo *et al.*, 1991) y los abrillantadores ópticos (Shapiro y Robertson, 1992). Al agregar abrillantadores ópticos como Leucophor BS® y Phorwite AR® se redujo la CL<sub>50</sub> para el virus de *Lymantria dispar* (L.) de 400 a 1,800 veces, dependiendo del material. En la práctica, no se ha encontrado que estos aditivos sean económicos bajo condiciones de campo.

Otro enfoque para aprovechar los productos virales costosos, es desarrollar métodos de aplicación diferentes a la esparción de tratamientos foliares. Ignoffo *et al.* (1980) encontraron que si las plántulas de repollo se sumergían en una suspensión de virus de *Trichoplusia ni* antes de plantarlas, la actividad del patógeno permanecía alta hasta por 84 días. Este enfoque redujo la cantidad de virus necesario para el tratamiento y minimizó los costos de mano de obra y de maquinaria.

## ALMACENAMIENTO DE VIRUS

En general, los cuerpos de inclusión de la mayoría de los NPV son estables al congelarse o refrigerarse y pueden permanecer viables por años.

## LIMITACIONES AMBIENTALES DE LOS VIRUS

Los baculovirus se degradan cuando están expuestos a la luz y al aire. Esta degradación es disminuida por la cubierta proteica de los NPV, pero la degradación aun limita la duración de la efectividad de una aplicación. La luz ultravioleta es la principal causa de la degradación viral. Materiales como los abrillantadores ópticos que absorben la luz ultravioleta podrían ser agregados para proteger los baculovirus, si se aprueban para incluirse en los productos de los plaguicidas microbiales.

## NIVEL DE EFICACIA Y ADOPCIÓN DE LOS INSECTICIDAS VIRALES

Al menos siete baculovirus están registrados actualmente para su uso en países de la OCDE (Kabaluk y Gazdik, 2004) (Tabla 23-1) y docenas más han sido objeto de investigación para usarse como plaguicidas microbiales (Moscardi, 1999).

El primer plaguicida viral para control de insectos fue Elcar® (*Helicoverpa/Heliiothis* NPV), el cual fue registrado en 1975 en los Estados Unidos para usarse contra *Helicoverpa zea* (Boddie). Sin embargo, el producto falló comercialmente debido a la introducción de una nueva clase de insecticidas, los piretroides sintéticos, que ocasionan mortalidad rápida y matan a una amplia gama de insectos plaga. En contraste, la alta especificidad de Elcar y su baja tasa de mortalidad fueron vistas como defectos del producto, el cual fue descontinuado en 1982. Una nueva formulación fue reintroducida en 1996 como GemStar® y este producto es usado para controlar *H. zea* y *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Moscardi, 1999). Este virus también es producido en China, donde es aplicado anualmente en varios cientos de miles de hectáreas de algodón y otros cultivos, para controlar las mismas plagas. Los NPVs de varias especies de *Spodoptera* son usados en muchos países para controlar gusanos soldados en maíz, arroz, trigo y hortalizas. En Europa y los Estados Unidos, el producto SPOD-X® está disponible para el control de *Spodoptera exigua* (Hübner) en cultivos de flores en invernadero. El NPV de *Heliiothis virescens* (F.) está registrado en varios países pero no es usado ampliamente excepto en Australia, donde se requiere su uso como un componente del manejo de la resistencia en el algodón Bt. En otras partes, su uso está declinando por la disponibilidad del algodón Bt (Federici, 2007).

Un granulovirus de la polilla de la manzana es comercializado para usarse en manzanas y es aplicado alrededor de 60,000 ha anualmente, principalmente en Europa (Moscardi, 1999). Sin embargo, este virus no alcanza niveles comerciales de protección a la fruta cuando la presión de la plaga es alta (Arthurs *et al.*, 2005).

También se han cultivado masivamente virus de varios defoliadores de bosques (larvas de Lepidoptera y de moscas sierra) con subsidios de agencias gubernamentales. Entre ellos se encuentran TM BioControl-1®, que es el NPV de la polilla del abeto Douglas *Orygia pseudotsugata* (McDunnough) y el virus que afecta a la polilla gitana, nombrado GypChek. Este virus fue producido en masa por el Servicio Forestal de los EU, en cantidades suficientes para 200,000 ha (Martignoni, 1999). El material puede ser almacenado indefinidamente en estado congelado y puede acumularse hasta que se necesite. GypChek ha sido producido y usado por agencias forestales estatales y federales para el control de las explosiones de población de la polilla gitana. Los costos de producción han sido efectuados con fondos públicos y no es un producto comercial.

Los baculovirus que han sido usados más extensamente, también con subsidio gubernamental, han sido los del gusano terciopelo de la soya *Anticarsia gemmatalis* Hübner en Brasil. Se desarrolló un producto con el virus, apoyado por el gobierno brasileño y por varias universidades, que es usado anualmente en varios millones de hectáreas de soya. La producción del virus está basada en las poblaciones de la plaga infectadas que ocurren en forma natural en los campos de los agricultores y después se cosechan los cadáveres de las larvas. Usando este enfoque, hasta 35 toneladas de cadáveres han sido cosechadas en años individuales para formularse como plaguicida viral (Moscardi, 1999).

Las estrategias que podrían hacer que los productos de baculovirus sean más competitivos económicamente incluyen (1) mezclar baculovirus con dosis bajas de insecticidas (menos de 1/6 de la dosis) y (2) agregar materiales que refuercen la actividad viral (p. ej., ácido bórico, quitinasa, extracto de neem) o que protejan a los virus de la degradación ambiental (abrillantadores ópticos) (Moscardi, 1999).

## NEMÁTODOS PARA CONTROL DE INSECTOS

### BIOLOGÍA DE LOS NEMÁTODOS

Las infecciones por nemátodos usualmente ocurren en el hemocele pero algunos grupos como los Phaenopsitylenchidae (p. ej., *Deladenus*) e Iotonchiidae (p. ej., *Paraiotonchium*) pueden invadir los órganos sexuales, causando debilidad, infertilidad, castración o muerte. Los nemátodos parasíticos obligados de este tipo son relativamente específicos en sus hospederos, estando asociados con un hospedero o con un pequeño grupo de hospederos. Otros nemátodos, como los esteinernemátidos y los heterorhabdítidos, sin embargo, tienen rangos amplios de hospederos.

Los nemátodos que parasitan insectos son translúcidos, usualmente elongados y cilíndricos. El cuerpo está cubierto con una cutícula elástica pero no es segmentado. Los nemátodos son animales multicelulares que poseen sistemas excretor, nervioso, digestivo, muscular y reproductivo bien desarrollados. No tienen sistema circulatorio ni respiratorio. El sistema digestivo consiste de boca, cavidad bucal, intestino, recto, y ano. La taxonomía de los nemátodos está basada principalmente en los caracteres sexuales de los adultos; en consecuencia, los inmaduros son difíciles de identificar sin técnicas moleculares.

Los nemátodos son diversos y se encuentran en casi todos los habitats. Las interacciones de los nemátodos con los insectos van desde la forosis hasta el parasitismo. Algunos nemátodos como *Deladenus (Beddingia) siricidicola* (Bedding) tienen ciclos vitales complejos, con fases parasíticas y de vida libre. Sin embargo, los nemátodos parasíticos de insectos criados comercialmente (*Steinernema* y *Heterorhabditis* spp.) tienen un ciclo de vida simple.

En las familias de nemátodos criados comercialmente (Steinernematidae y Heterorhabditidae), el *estado infeccioso juvenil (EJ)*, o *estado dauer*, es el único de vida libre (el único que se encuentra fuera del cuerpo del hospedero). Es el tercer estado juvenil y es el que infecta a los nuevos hospederos. Es el estado en que se encuentran los productos comerciales de nemátodos. Busca un hospedero y entra por aberturas naturales o a través de secciones delgadas de la cutícula. Unas pocas horas después de la penetración, los juveniles infecciosos liberan bacterias simbióticas, entonces mudan al cuarto estado y después al adulto. En el género *Steinernema*, los adultos se aparean y las hembras producen huevos. Los huevos usualmente se desarrollan en juveniles infecciosos. Usualmente hay tres generaciones en el mismo hospedero. En el género *Heterorhabditis*, los juveniles infecciosos se desarrollan en hermafroditas que producen huevos. La siguiente generación tiene tres sexos: machos, hembras y hermafroditas. El resto del ciclo de vida es igual que para *Steinernema*.

La búsqueda de hospederos por los nemátodos puede ser un proceso activo en el que se mueven hacia los hospederos y los reconocen, usando señales como los gradientes bacterianos, componentes fécales del hospedero, dióxido de carbono (Grewal *et al.*, 1993) o compuestos liberados por las raíces de las plantas, en respuesta a la herbivoría en la raíz (Rasmann *et al.*, 2005). Las especies de nemátodos varían en sus estrategias de búsqueda de hospederos, algunos son depredadores emboscadores y otros son cazadores activos

(Kaya *et al.*, 1993). En los nemátodos esteinernemátidos y los heterorhabdítidos, la penetración del hospedero es un proceso activo en el que los juveniles directamente entran por la boca, ano o los espiráculos, o usan proteasas para penetrar el integumento. La infección del nemátodo es dentro del hemocele. La infección produce relativamente pocos signos externos antes de la muerte. Los efectos internos, sin embargo, pueden ser severos. La esterilidad es inducida por varios grupos de nemátodos, incluyendo *D. siricidicola*, la especie usada para suprimir a las avispas de la madera en Australia.

De las nueve familias de nemátodos parasíticos de insectos, sólo los Steinernematidae y los Heterorhabditidae pueden ser criados en forma económica para uso comercial. Estas familias pueden ser criadas fácilmente si se les proporcionan las bacterias simbióticas y un medio de cultivo no vivo. Los Steinernematidae y los Heterorhabditidae matan a sus hospederos en dos o tres días, un tiempo mucho más corto que en los otros grupos de nemátodos. Esto ocurre porque tienen bacterias simbióticas en el intestino (*Xenorhabdus* spp., *Photorhabdis* spp.) que matan a los hospederos por septicemia (Burnell y Stock, 2000). Los nemátodos juveniles infecciosos alcanzan el hemocele al penetrar la pared del intestino medio o el integumento del hospedero. Las bacterias *Xenorhabdus* spp. o *Photorhabdis* spp., liberadas en el hemocele del hospedero por la defecación de los nemátodos, matan después al hospedero. Los nemátodos se alimentan de las bacterias simbióticas, maduran y pasan a ser adultos reproductivos. Después de varias generaciones, los nemátodos juveniles infecciosos salen del cuerpo en descomposición del hospedero. Más detalles sobre la biología de grupos específicos de nemátodos fueron publicados por Gaugler y Kaya (1990), Kaya (1993), y Tanada y Kaya (1993).

## CRÍA MASIVA DE NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS

Todos los nemátodos pueden ser criados en hospederos vivos. Por ejemplo, los heterorhabdítidos y los esteinernemátidos, los grupos de mayor interés comercial, pueden ser criados en larvas de la polilla mayor de la cera *Galleria mellonella* (L.). Se han descrito los métodos de cría de los insectos hospederos, incluyendo la infección por los nemátodos, la cosecha y el almacenamiento de los juveniles de dichas familias (Dutky *et al.*, 1964; Woodring y Kaya, 1988; Lindegren *et al.*, 1993). Los nemátodos son cosechados al permitirles nadar lejos del cadáver del hospedero, dentro de un dispositivo de recolección. Este sistema es relativamente caro, con un costo de cerca de un dólar de EU (de 1990) por cada millón de juveniles infecciosos.

Para la producción comercial de nemátodos heterorhabdítidos y esteinernemátidos pueden usarse medios no vivos en sistemas automatizados, a gran escala. Glaser *et al.* (1940) fueron los primeros en tratar de criar a gran escala estos nemátodos en medios no vivos. Tales medios deben (1) usar ingredientes estériles para evitar la indeseable contaminación bacteriana, (2) retener la bacteria simbiótica específica del nemátodo (*Xenorhabdus* spp., *Photorhabdus* spp.), y (3) proporcionar todos los nutrientes necesarios para el crecimiento (Lunau *et al.*, 1993).

Históricamente, existían tres retos para el desarrollo a gran escala de la cría eficiente de nemátodos: (1) identificar nutrientes baratos, (2) identificar las condiciones del cultivo que promovieran altos rendimientos, y (3) usar medios de cultivo líquidos en lugar de

los sólidos (Friedman, 1990). Ahora se conocen medios efectivos de cultivo, cuya composición es un secreto comercial de los productores. Para lograr la cría en medios líquidos en tanques grandes fue necesario agregar oxígeno mecánicamente, tomando en cuenta la susceptibilidad de los nemátodos al daño por los cortes causados por la agitación o el burbujeo. Los métodos que lo hacen tan efectivo han sido desarrollados ahora y los productores comerciales rutinariamente usan fermentadores de 10,000 litros o más para la producción de nemátodos (Ehlers *et al.*, 1998).

## FORMULACIÓN Y APLICACIÓN DE NEMÁTODOS

Los nemátodos han sido formulados en muchas opciones diferentes, incluyendo la combinación con alginato, arcilla, carbón activado, poliacrilamidas formadoras de gel, vermiculita, turba, evaporetardadores o protectores de los rayos ultravioleta, siendo colocados en esponjas o en cebos, y siendo almacenados en forma anhidrobiótica (Georgis, 1990). Ver Shapiro-Ilan *et al.* (2006) para una revisión de la tecnología de la aplicación y de las restricciones impuestas a los nemátodos por las limitaciones ambientales. Las formulaciones son hechas para prolongar la sobrevivencia de los nemátodos durante el almacenamiento, mejorando la facilidad de manejo o su desempeño después de la aplicación. El desarrollo de una formulación concentrada fluida, por ejemplo, eliminó la necesidad de disolver una matriz portadora y suspender a los nemátodos antes de la aplicación. En general, los nemátodos son efectivos solamente cuando son aplicados al suelo o cuando entran a los tejidos de las plantas (contra barrenadores o minadores de hojas). Los barrenadores en los tallos de zarzamoras y especies relacionadas, por ejemplo, pueden ser objetivos para los nemátodos si se aplican como aspersion y entran a los túneles de los tallos, donde se alimentan las larvas de la plaga (Miller y Bedding, 1982). Los nemátodos pueden ser dirigidos contra insectos que atacan raíces de cultivos como el repollo, aplicándolos a las plántulas antes de plantarlas. Ellos están inmediatamente en la posición de proteger a las plantas. En el césped, la penetración de los nemátodos a través de la paja en la zona radicular es crítica para el control efectivo. El desplazamiento de los nemátodos hacia abajo puede ser reforzado en pequeñas áreas como los campos de golf, regando después de la aplicación (Shetlar *et al.*, 1988). El riego puede no ser posible a mayor escala, como en los pastizales, debido a las grandes cantidades de agua necesaria. Berg *et al.* (1987), sin embargo, describieron un dispositivo mecánico que usa un taladro para introducir los nemátodos a la zona radicular, reduciendo el agua necesaria desde 20,000 a sólo 1,520 l/ha. En cítricos, los nemátodos pueden ser aplicados a través del agua de riego dirigida a las raíces de los árboles (**Figura 24-6**). Los esfuerzos para desarrollar formulaciones que permitan que los nemátodos sean aplicados contra plagas foliares de vida libre generalmente no han tenido éxito, excepto en los trópicos húmedos.



**Figura 24-6.** Para controlar un picudo de la raíz de los cítricos (*Diaprepes abbreviatus* L.), los nemátodos pueden ser aplicados a través del sistema de riego, usando microaspersores en la base de los árboles, los que colocan a los nemátodos directamente sobre la zona radicular. (Fotografía cortesía de Steve LaPointe, USDA-ARS.)

## ALMACENAMIENTO DE NEMÁTODOS

Los nemátodos heterorhabdítidos y esteinernemátidos sobreviven bien por varios meses si son refrigerados y almacenados en capas delgadas, húmedas y bien aireadas. Con algunas excepciones, los esteinernemátidos sobreviven mejor al almacenarse a 5-10°C y los heterorhabdítidos entre 10-15°C (Georgis, 1990). Chen y Glazer (2005) reportan que las soluciones hiperosmóticas (para deshidratar e inmovilizar parcialmente a los nemátodos, evitando el movimiento que desperdiciaría energía), acopladas con la encapsulación en gránulos de alginato (para conservar el agua remanente en los nemátodos) lograron que los nemátodos sobrevivieran bien hasta por 6 meses, al ser almacenados a temperatura ambiente y al 100% de humedad relativa. Los nemátodos formulados de esta manera tuvieron una sobrevivencia del 96-100% por 6 meses a 23° C, comparados con sólo un 10-15% para los nemátodos almacenados en agua sola o en gránulos de alginato sin tratamiento. La tasa de infección de los nemátodos formulados de esta manera y almacenados por 6 meses fue del 23%, comparable con los nemátodos frescos y fue mucho mayor que el 2% de infectividad de los nemátodos formulados sólo con gránulos de alginato y almacenados durante el mismo período.

## LIMITACIONES AMBIENTALES DE LOS NEMÁTODOS

La principal limitación del uso de nemátodos es su requerimiento de agua como un medio en el cual se mueven hacia los hospederos, y su sensibilidad a la resequedad y a la luz ultravioleta, limitando su uso al suelo y otros ambientes húmedos. Estas características básicas de su biología son desventajas que parecen imposibles de superar por la tecnología.

## NIVEL DE EFICACIA Y ADOPCIÓN DE LOS NEMÁTODOS PARA CONTROL DE INSECTOS

Los nemátodos como bioplaguicidas han logrado un nicho estable pero pequeño, en el control de plagas. A menudo trabajan bien contra plagas del suelo y coinciden con la filosofía de la agricultura orgánica. Ver Georgis *et al.* (2006) para una revisión plaga por plaga de la eficacia del uso aumentativo de nemátodos. La EPA de los EU no requiere que los productos de los nemátodos sean registrados como plaguicidas, lo que disminuye el costo de llevar nuevos productos al mercado. Además, continúan descubriéndose nuevas especies de nemátodos aptas para atacar nuevas plagas importantes o lograr el control bajo condiciones de suelo que eran desfavorables para especies comercializadas previamente. Estas nuevas especies y cepas hacen posible expandir el mercado de los nemátodos. *Steinernema scarabaei* Stock & Koppenhöfer, por ejemplo, es una nueva especie que parece ser efectiva contra más larvas de escarabajos plaga del césped que las disponibles antes (Koppenhöfer y Fuzy, 2003). Similarmente, *Steinernema riobrave* Cabanillas, Poiner & Raulston, descubierta a mediados de los 1990s, funciona bien en suelos calientes y se ha encontrado que mejora el control en Florida (EU) de un picudo de la raíz de los cítricos, *Diaprepes abbreviatus* (L.) (Bullock *et al.*, 1999). En climas húmedos como en Indonesia, las aspersiones foliares de nemátodos pueden ser alternadas con aplicaciones de *B. thuringiensis* para controlar a la polilla dorso de diamante *Plutella xylostella* (L.) para retrasar el desarrollo de la resistencia al Bt (Schroer *et al.*, 2005).

## SEGURIDAD DE LOS BIOPLAGUICIDAS

La mayoría de los microbios y de los nemátodos usados como agentes de control biológico ocurren naturalmente en muchos ambientes, a menudo en grandes cantidades durante las epizootias. Sin importar ese potencial a la exposición humana, la literatura médica no registra casos en que estos agentes infecten a la gente.

En muchos países, incluyendo los Estados Unidos, la Unión Europea, Rusia y Japón, los plaguicidas microbiales comerciales deben ser registrados como productos plaguicidas, en la agencia gubernamental apropiada. El registro requiere que su seguridad sea demostrada a la agencia reguladora, antes de ser comercializado. Los requisitos del registro generan información de que el producto microbial, en la forma en que es elaborado y ofrecido a la venta, es seguro de usar como se recomienda en la etiqueta. La información requerida difiere de la solicitada para el registro de plaguicidas químicos. Como mínimo, los datos necesarios son (1) identificar al patógeno, (2) definir los métodos usados para producirlo, (3) demostrar que el

producto comercial está libre de la contaminación de otros microbios potencialmente peligrosos, y (4) demostrar que el patógeno no infecta al hombre ni a los animales domésticos.

Además, pueden necesitarse estudios del destino del patógeno en el medio ambiente o de su efecto en otros organismos (ver Betz *et al.*, 1990). Por ejemplo, ver la evaluación del efecto de *B. thuringiensis israelensis* en otros organismos acuáticos (Merritt *et al.*, 1989; Welton y Ladle, 1993). Los países con producción comercial de gusanos de seda u otros artrópodos pueden requerir que las preparaciones de *B. thuringiensis* no contengan esporas vivas sino sólo las toxinas derivadas del patógeno (Aizawa, 1990). Se han desarrollado los procedimientos de prueba para los agentes microbiales para estimar los riesgos a las plantas (Campbell y Sands, 1992), peces y crustáceos (Spacie, 1992), aves (Kerwin, 1992), mamíferos (Siegel y Shaddock, 1992) y para insectos y ácaros no destinados a ser controlados por el producto (Fisher y Briggs, 1992).

Sistemas locales de producción de patógenos pueden ser desarrollados en países que no requieran registro gubernamental de productos plaguicidas microbiales (Antía-Londoño *et al.*, 1992). La producción de patógenos a nivel pueblo o granja, o la de productores dentro de un país, debería ser monitoreada por las agencias de salud del gobierno para asegurar que esos sistemas, en la forma en que operan, producen preparaciones de alta calidad del patógeno seleccionado y que esté libre de otros agentes microbiales.

Los requisitos para el registro de plaguicidas microbiales han sido resumidos para los Estados Unidos (Environmental Protection Agency, 1983; Betz *et al.*, 1990), Europa (Quinlan, 1990) y Japón (Aizawa, 1990). Aunque los requisitos de cada país difieren algo y cambian con el tiempo, el gran tema es tratar a los plaguicidas microbiales bajo las mismas leyes que los plaguicidas químicos y variar los datos requeridos, según las diferencias entre los compuestos químicos y los agentes infecciosos.

## SEGURIDAD DE LAS BACTERIAS

La seguridad de las toxinas Bt en muchos organismos está basada en una serie de requisitos para lograr el efecto tóxico. Primero, son venenos estomacales y no son tóxicos para ningún organismo, a menos que sean ingeridos (en contraste con la mayoría de los insecticidas). Segundo, la activación de los cristales Bt requiere de un intestino alcalino (pH arriba de 8), como el de las larvas de lepidópteros pero no de los vertebrados. Enseguida de la activación, las proteasas del intestino medio del insecto deben partir la toxina y entonces la toxina debe ligarse a los receptores de glicoproteínas en las membranas de los microvilli del intestino medio. El requisito de esta serie de eventos hace que estas toxinas no sean dañinas para la mayoría de los organismos.

La endotoxina beta producida por algunas cepas de *B. thuringiensis* es tóxica en ratones y pollos pero las cepas usadas para control de plagas no producen dicha toxina (Podgwaite, 1986). Las cepas de uso comercial no infectan al humano ni a otros vertebrados. Las pruebas de laboratorio con *B. sphaericus* y *B. thuringiensis israelensis* (Shaddock *et al.*, 1980; Siegel y Shaddock, 1990a) y *Clostridium bifermentans* Weinberg & Séguin serovar *malaysia* (Thiery *et al.*, 1992), indicaron que estas bacterias no causan efectos patogénicos en vertebrados. La literatura sobre *B. sphaericus* y *B. thuringiensis* (Siegel y Shaddock, 1990b, c) indica que estos microbios son seguros para usarse como agentes de control de plagas en las circunstancias que involucran la exposición humana.

La mayoría de las cepas de Bt pueden matar a otros insectos cercanamente relacionados a la plaga a controlar. Por ejemplo, *Bt kurstaki* es capaz de matar muchas especies de Lepidoptera. Miller (1990) evaluó el efecto de las aplicaciones de *B. thuringiensis kurstaki* sobre otros Lepidoptera de bosque en Oregon; algunas especies encontradas en las áreas testigo estuvieron ausentes en las áreas tratadas pero el grado de impacto fue menor que el de las aplicaciones de plaguicidas químicos. Las aplicaciones de *B. thuringiensis* en bosques deciduos en los Montes Apalaches del este de los EU redujeron la densidad de algunas larvas de lepidópteros que se deseaban controlar (Wagner *et al.*, 1996; Rastall *et al.*, 2003). Larvas como los gusanos de seda son susceptibles a algunas cepas de *B. thuringiensis* pero no a todas. Otros insectos que no estén cercanamente emparentados con la plaga típicamente no son afectados. Por ejemplo, *B. sphaericus* y *B. thuringiensis* no afectan a las abejas mieleras bajo condiciones de campo (Vandenberg, 1990).

*Bacillus thuringiensis israelensis*, cuando es aplicado en sistemas acuáticos, mata larvas de moscas de las familias Chironomidae, Dixidae y Ceratopogonidae. La densidad de estos grupos puede ser moderada o severamente reducida (Flexner *et al.*, 1986). Merritt *et al.* (1989) evaluaron las consecuencias de la aplicación de *B. thuringiensis israelensis* en los ríos de Michigan para el control de larvas de jevenes y no encontraron efectos detectables en (1) los números de otros insectos acuáticos muertos que estaban a la deriva corriente abajo, (2) los números de los insectos que viven en el fondo en las muestras tomadas, (3) el crecimiento o mortalidad de larvas de moscas de mayo enjauladas, o (4) en la mortalidad o la alimentación de diversos peces, especialmente el róbalo de las rocas. Colectivamente, estos datos sugieren poco impacto de las aplicaciones de *Bti* en las corrientes, aparte de los jevenes. Las revisiones de los efectos no deseados del *Bti* en el mundo sugieren un bajo potencial de efecto en las cadenas alimenticias acuáticas (Boisvert y Boisvert, 2000; ver también, Glare y O'Callaghan, 2000). Muchos estudios han demostrado que los efectos del Bt en otros organismos o en cultivos cercanos es insignificante, especialmente en comparación con el uso de plaguicidas convencionales (Sears *et al.*, 2001; O'Callaghan *et al.*, 2005), mejorando bastante los cultivos como habitats para los enemigos naturales.

## SEGURIDAD DE LOS HONGOS

Entre los hongos que han sido desarrollados para uso comercial como agentes de control de plagas, en la mayoría no se ha encontrado que infecten al humano o a otros vertebrados (Podgwaite, 1986). Ningún daño se observó en ratones alimentados o expuestos a *Nomuraea rileyi* (Farlow) (Ignoffo *et al.*, 1979), en ratas, conejos y conejillos de indias expuestos a *H. thompsonii* (McCoy y Heimpel, 1980) o en ratones inyectados con *L. muscarium* (antes *lecanii*) (Podgwaite, 1986) o con *L. giganteum* (Kerwin *et al.*, 1990). Sin embargo, *B. bassiana* ha sido reportado por causar alergias en humanos (York, 1958) y por ser un patógeno oportunista en el hombre y en otros mamíferos (Burges, 1981b). Además, dos especies de *Conidiobolus* (Entomophthorales) han sido reportadas de ser patogénicas a los humanos (Wolf, 1988).

La toxicidad potencial de los compuestos químicos secretados por los hongos, especialmente durante su producción en medios de cultivo ricos en nutrientes, constituye un riesgo separado al de las infecciones directas. Un grupo de metabolitos secundarios potenciales ha sido reconocido en especies de *Beauveria*, *Metarhizium* y otros grupos, incluy-

endo destruxinas, efrapeptinas, oosporeina, beauvericina y beauveriólidos (Strasser *et al.*, 2000). Los riesgos de los metabolitos secundarios asociados con hongos particulares son difíciles de generalizar y deberían ser evaluados de acuerdo a cada caso individual. Strasser *et al.* (2000) ofrecen una revisión de estas clases de metabolitos y de sus propiedades.

La mortalidad de otros invertebrados a partir del contacto externo con esporas de hongos bioinsecticidas típicamente es menor al 10% (Flexner *et al.*, 1986). Puede ocurrir mayor mortalidad si se ingieren esporas fungosas. Las larvas de *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant sufrieron un 50% de mortalidad cuando comieron esporas de *B. bassiana*. Sin embargo, las mariquitas adultas no fueron afectadas (Flexner *et al.*, 1986). Las obreras de las abejas mieleras tuvieron un 29% de mortalidad cuando comieron esporas de *H. thompsonii* (Cantwell y Lehnert, 1979). *B. bassiana* y *M. anisopliae* infectan a los gusanos de seda *Bombyx mori* (L.) y han sido asociados con la muerte de abejas mieleras después de las aplicaciones en el campo (Podgwaite, 1986). Las formulaciones miceliales granulares de hongos parecen ser relativamente seguras para otros organismos.

## SEGURIDAD DE LOS VIRUS

Los baculovirus no presentan riesgos de salud para los vertebrados. Varios NPVs han sido probados extensamente, usando más de 24 especies de mamíferos, aves y peces; ninguno infectó vertebrados (Burges *et al.*, 1980; Podgwaite, 1986). Los granulovirus han sido probados en menor extensión pero los datos disponibles sugieren que sólo infectan Lepidoptera.

Los riesgos de los baculovirus para otros insectos también parecen ser desde bajos hasta nulos. La mayoría de los baculovirus tienen rangos estrechos de hospederos, infectando típicamente sólo especies de uno o unos pocos géneros emparentados, usualmente de la misma familia. En consecuencia, los invertebrados más distantes (otros órdenes u otras familias) no están en riesgo con las aplicaciones de virus (Podgwaite, 1986). Se han encontrado unos pocos baculovirus con rangos de hospederos más amplios, tal como el NPV de *Autographa californica*, el cual infecta al menos a 43 especies de Lepidoptera.

## SEGURIDAD DE LOS NEMÁTODOS

Los nemátodos son considerados seguros para el hombre y para otros vertebrados por la mayoría de los gobiernos y están, en consecuencia, exentos de las leyes de registro de productos plaguicidas. Las ratas expuestas en forma oral o por inyección a *Steinernema carpocapsae* (Weiser) no mostraron signos de patogenicidad, toxicidad o infección (Gaugler y Boush, 1979).

Los nemátodos de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae tienen rangos de hospederos fisiológicamente amplios dentro de los insectos. Sin embargo, se cree que los riesgos de las aplicaciones de nemátodos son bajos para otras especies que no son plagas (Akhurst, 1990; Jansson, 1993), en parte porque los nemátodos tienen movilidad limitada y están restringidos a ambientes específicos, debido a su intolerancia a la resequeidad y a otras condiciones físicas desfavorables (Georgis *et al.*, 1991). Se ha demostrado que *Steinernema carpocapsae* no tiene efecto en lombrices terrestres intactas (*Aporrecto-*

*dea* sp.) (Capinera *et al.*, 1982). Georgis *et al.* (1991) no observaron daños sobre otros artrópodos del suelo (aparte de la plaga) en el césped de campos de golf, en campos de maíz, repollo, ni en pantanos con arándanos agrios (*Vaccinium macrocarpon* Aiton) por las aplicaciones de nemátodos esteinernemátidos o heterorhabdítidos. Sin embargo, las aplicaciones de nemátodos entomopatógenos reducen las poblaciones de nemátodos parasíticos de plantas en pruebas de laboratorio, invernadero y campo.

## PATÓGENOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE

La ingeniería genética puede ser usada para alterar patógenos microbiales para su uso en control biológico. Proyectos anteriores han alterado la virulencia o los rangos de hospederos de algunos baculovirus (Betz, 1986; Wood y Granados, 1991) y de la bacteria *B. thuringiensis* (Gelernter, 1992). Se ha logrado el cese más rápido de hospederos infectados con baculovirus, incorporando genes de toxinas de escorpión al NPV de *Autographa californica* que codifican para la producción de una neurotoxina específica de insectos (Stewart *et al.*, 1991).

En principio, los agentes virales con rangos de hospederos demasiado amplios podrían poner en riesgo a polillas o mariposas nativas. Williamson (1991), por ejemplo, estimó que del 5-10% de los Lepidoptera de Gran Bretaña serían susceptibles a una cepa del virus de *Autographa californica* que había sido modificado para expandir su rango de hospederos. El recomendó más modificaciones genéticas como la remoción del gen poliedro para hacer al virus incapaz de una persistencia sostenida en la naturaleza. Pruebas de campo con el virus modificado de *Autographa californica* indicaron que tal sistema de remover genes para la producción de proteína del poliedro quitaba al virus su persistencia (Possee *et al.*, 1990). La eficacia bajo condiciones de campo se reduce porque los virus no ocluidos son inactivados rápidamente. La co-oclusión (en la que el virus modificado y el virus tipo silvestre son usados para infectar hospederos simultáneamente para producir virus de ambas cepas en cuerpos de oclusión compartidos) ha sido propuesta como una estrategia para permitir su uso eficiente (Wood *et al.*, 1994). Wood y Granados (1991) publicaron un resumen de los usos potenciales de los baculovirus modificados genéticamente. Los virus modificados serían más o menos una amenaza si las modificaciones impuestas a ellos aumentan o disminuyen su habilidad intrínseca. La evaluación de algunos virus que han sido modificados para mejorar el control de plagas indican que los virus modificados son menos hábiles que sus tipos silvestres, reduciendo los riesgos que podrían tener (Cory, 2000).

Los NPVs modificados genéticamente, sin embargo, no han sido comercializados y parece improbable que lo sean, en parte porque los cultivos Bt han quitado la mayoría de los incentivos del mercado y en parte porque parece improbable la aprobación del gobierno para el registro de virus que contienen genes que codifican por químicos como veneno de escorpión.