



## Capítulo III

### **Control de calidad de bioinsumos recomendados para el manejo de fitopatógenos (bacterias y hongos)**

Liz Alejandra Uribe Gutiérrez

Los bioinsumos agrícolas son productos biológicos elaborados a partir de organismos o sus derivados, desarrollados para la protección de los cultivos y el medio ambiente (Parada & Muñoz, 2015). Garantizar la eficacia de los bioinsumos que se comercializan es un parámetro crucial para que los productores los adopten y para el control de enfermedades tanto en campo como durante la postcosecha. En ese sentido, el control de calidad hace referencia al conjunto de acciones destinadas a garantizar la producción uniforme de lotes de productos terminados que satisfagan los parámetros de identidad, pureza y actividad biológica (eficacia) establecidos por cada casa comercial. La evaluación de la actividad biológica se logra mediante la elaboración de pruebas experimentales en laboratorio o invernadero, donde el diseño, la selección y la estandarización de protocolos son pasos esenciales para asegurar la calidad de los resultados. A continuación, se proponen una serie de metodologías *in vitro* que pueden ser empleadas para la evaluación de la actividad biológica de diferentes agentes de control seleccionados como principios activos de bioinsumos y recomendados para el manejo de hongos o bacterias fitopatógenas.



## Criterios biológicos

Con el fin de lograr una evaluación acertada y evitar falsos positivos o falsos negativos, los aspectos relacionados con el microorganismo patógeno, el agente de control biológico y el tipo de formulación son criterios biológicos que se deben tener en cuenta al evaluar la efectividad de un bioplaguicida.

## Microorganismos patógenos

El planeta tierra abarca alrededor de  $10^{12}$  de especies de microorganismos pertenecientes a diferentes órdenes y con capacidad de vivir en una amplia diversidad de hábitats, incluidos ambientes extremos (Locey & Lennon, 2016). Varios de ellos están involucrados en procesos importantes como, por ejemplo, los ciclos biogeoquímicos, los procesos de biorremediación, la producción de antibióticos y la producción de alimentos, entre otros (Caplice & Fitzgerald, 1999; Falkowski et al., 2008; Harekrushna & Kumar, 2012; Rokem et al., 2007). Sin embargo, varios de ellos son clasificados como patógenos dado que, para sobrevivir, parasitan o consumen tejidos vegetales, asunto que constituye uno de los principales problemas para la producción agrícola (Cotes, 2018).

Dentro de los diferentes grupos de microorganismos patógenos, los hongos son los que causan el mayor número de enfermedades, con alrededor de 8.000 especies reportadas dentro de las que se incluyen: *Magnaporthe oryzae*, *Botrytis cinerea*, varias especies de *Puccinia* spp., *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp. y *Rhizoctonia solani*, entre otras (Dean et al., 2012; Ellis et al., 2008). También se reportan microorganismos fitopatógenos del grupo de los Oomycetes, principalmente varias especies del género *Phytophthora* spp. Finalmente, también se reportan bacterias como *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Agrobacterium tumefaciens* y varias especies del género *Xanthomonas* spp., entre otras (Dean et al., 2012; Kamoun et al., 2015; Mansfield et al., 2012).

En la tabla 3.1 se relacionan los principales patógenos reportados con mayor prevalencia en algunos de los cultivos más importantes de Colombia durante el año 2019 (Montes, 2019). En primera instancia, *Colletotrichum* spp., *Phytophthora* spp. y *Fusarium* sp. son los de mayor incidencia, seguidos de *Botrytis* sp., *Sclerotinia* spp. y, finalmente, *Erwinia* sp., *Oidium* sp., *Alternaria* sp. y *Cercospora* sp., entre otros.

**Tabla 3.1.** Principales patógenos que afectan algunos de los cultivos más importantes en Colombia en 2019

| Patógeno                                                      | Enfermedad                                     | Cultivo                  | Referencia                                                                                                                                     |
|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Ralstonia solanacearum</i><br>Raza 2                       | Moko o madurabiche                             | Banano                   | Alarcón & Jiménez (2012)                                                                                                                       |
| <i>Dickeya chrysanthemi</i>                                   | Pudrición acuosa del pseudotallo o bacteriosis | Banano                   | Alarcón & Jiménez (2012)                                                                                                                       |
| <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Cubense</i>               | Mal de Panamá                                  | Banano                   | Alarcón & Jiménez (2012)                                                                                                                       |
| <i>Mycosphaerella fijiensis</i> Morelet var. <i>Difformis</i> | Sigatoka negra                                 | Banano                   | Alarcón & Jiménez (2012)                                                                                                                       |
| <i>Phytophthora cinnamomi</i><br>var <i>cinnamomi</i> Rands   | Pudrición radical                              | Aguacate                 | Castaño & Leal (2018); Gil et al., (2015)                                                                                                      |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>                         | Antracnosis                                    | Aguacate                 | Granada et al. (2018)                                                                                                                          |
| <i>Phytophthora</i> spp.                                      | Gomosis                                        | Cítricos: lima y naranja | Alarcón & Jiménez 2012                                                                                                                         |
| <i>C. gloeosporioides</i> y <i>Colletotrichum. Acutatum</i>   | Antracnosis                                    | Cítricos: lima y naranja | Alarcón & Jiménez (2012)                                                                                                                       |
| <i>Erwinia chrysanthemi</i>                                   | Pudrición acuosa                               | Piña                     | Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo [Aecid] & Escuela de Agricultura de la Región Tropical Húmeda [Earth] (s. f.) |
| <i>Phytophthora parasitica</i>                                | Pudrición del corazón                          | Piña                     | Aecid & Earth (s. f.)                                                                                                                          |
| <i>Phytophthora cinnamomi</i>                                 | Pudrición de la raíz                           | Piña                     | Aecid & Earth (s. f.)                                                                                                                          |
| <i>Fusarium</i> sp.                                           | Fusariosis – Pudrición                         | Piña                     | Ríos et al. (2019)                                                                                                                             |
| <i>Dyckeya</i> sp.                                            | Pudrición bacterial                            | Piña                     | Ríos et al. (2019)                                                                                                                             |
| <i>Thielaviopsis</i> sp.                                      | Pudrición negra                                | Piña                     | Ríos et al. (2019)                                                                                                                             |

(Continúa)

(Continuación tabla 3.1)

| Patógeno                           | Enfermedad                   | Cultivo         | Referencia                                                                                                                  |
|------------------------------------|------------------------------|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>C. gloeosporioides</i>          | Antracnosis                  | Mango           | Asociación Hortifrutícola de Colombia [Asohfrucol] & Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria [Corpoica] (2013) |
| <i>Fusarium subglutinans</i>       | Malformación                 | Mango           | Asohfrucol & Corpoica (2013)                                                                                                |
| <i>Lasiodiplodia</i> sp.           | Secamiento o muerte          | Mango           | Asohfrucol & Corpoica (2013)                                                                                                |
| <i>C. gloeosporioides</i>          | Antracnosis                  | Tomate de árbol | Cámara de Comercio de Bogotá [CCB] (2015a)                                                                                  |
| <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>    | Moho blanco                  | Tomate de árbol | CCB (2015a)                                                                                                                 |
| <i>Botrytis cinerea</i>            | Moho gris                    | Tomate de árbol | CCB (2015a)                                                                                                                 |
| <i>Oidium</i> sp.                  | Mildeo polvos                | Tomate de árbol | CCB (2015a)                                                                                                                 |
| <i>Alternaria</i> sp.              | Tizón foliar                 | Tomate de árbol | CCB (2015a)                                                                                                                 |
| <i>Erwinia</i> sp.                 | Marchitamiento y la necrosis | Papaya          | EncuRed (s. f.)                                                                                                             |
| <i>Phytophthora palmivora</i>      | Damping off                  | Papaya          | EncuRed (s. f.)                                                                                                             |
| <i>Cercospora papayae</i> Hansford | Mancha negra                 | Papaya          | EncuRed (s. f.)                                                                                                             |
| <i>C. gloeosporioides</i>          | Antracosis                   | Papaya          | EncuRed (s. f.)                                                                                                             |
| <i>Colletotrichum fragariae</i>    | Antracnosis                  | Fresa           | Ventura et al. (2018)                                                                                                       |
| <i>Phytophthora cactorum</i>       | Pudrición de la corona       | Fresa           | Cano (2013)                                                                                                                 |
| <i>B. cinerea</i>                  | Moho gris                    | Fresa           | Cano (2013)                                                                                                                 |
| <i>Dothiorella</i> sp.             | Pudrición apical del fruto   | Guayaba         | Castellano et al. (2003)                                                                                                    |
| <i>Pestalotia versicolor</i>       | Roña o clavo                 | Guayaba         | Leiva et al. (2018)                                                                                                         |
| <i>Colletotrichum</i> sp.          | Antracnosis                  | Guayaba         | Leiva et al. (2018)                                                                                                         |
| <i>Phytophthora</i> sp.            | Pudriciones radicales        | Guayaba         | Leiva et al. (2018)                                                                                                         |

(Continúa)

(Continuación tabla 3.1)

| Patógeno                        | Enfermedad                                     | Cultivo | Referencia                 |
|---------------------------------|------------------------------------------------|---------|----------------------------|
| <i>Phytophthora infestans</i>   | Tizón del lulo o gota                          | Lulo    | CCB (2015b); Tamayo (2001) |
| <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> | Moho blanco, lama blanca, pudrición algodonosa | Lulo    | CCB (2015b); Tamayo (2001) |
| <i>C. gloeosporioides</i>       | Antracnosis                                    | Lulo    | CCB (2015b); Tamayo (2001) |
| <i>Sclerotium rolfsii</i>       | Pudrición del tallo                            | Lulo    | CCB (2015b); Tamayo (2001) |
| <i>F. oxysporum</i>             | Marchitez vascular                             | Lulo    | CCB (2015b); Tamayo (2001) |
| <i>B. cinerea</i>               | Moho gris                                      | Mora    | Arévalo et al. (2011)      |
| <i>C. gloeosporioides</i>       | Antracnosis                                    | Mora    | Arévalo et al. (2011)      |
| <i>Oidium</i> sp.               | Mildeo polvoso                                 | Mora    | Arévalo et al. (2011)      |
| <i>Peronospora sparsa</i> Berk. | Mildeo velloso                                 | Mora    | Arévalo et al. (2011)      |

Fuente: Elaboración propia

Los microorganismos patógenos se pueden clasificar en cuatro categorías: la primera, saprófitos obligados, correspondientes a aquellos organismos que solo pueden colonizar y sobrevivir en materia orgánica muerta o en descomposición; la segunda, parásitos obligados, que incluye a todos los microorganismos que solo pueden vivir en un huésped vivo como, por ejemplo, mildeo polvoso, mildeo velloso, royas, entre otros; la tercera, parásitos facultativos, los cuales generalmente viven como saprófitos, pero tienen la habilidad de parasitar y causar enfermedad bajo condiciones favorables como, por ejemplo, *Pythium* spp. y varias especies de bacterias fitopatógenas y, por último, la cuarta, los saprófitos facultativos, que corresponden a aquellos microorganismos que generalmente viven como parásitos pero tienen la capacidad de utilizar la materia orgánica muerta o en descomposición bajo ciertas condiciones como, por ejemplo, microorganismos del género *Phytophthora* spp. y *Botrytis* spp. (Ellis et al., 2008).

Los microorganismos patógenos pueden infectar diversos tipos de plantas en diferentes estados de desarrollo. Se pueden clasificar en patógenos foliares, patógenos del suelo o endófitos según el tejido que infectan como, por ejemplo, los que afectan la filósfera, la rizosfera, tejidos vasculares, semillas, etc. Pueden causar afectaciones tanto en campo como durante la postcosecha y causar pérdidas económicas consi-

derables además de la pérdida del alimento en sí. Se estima que más de la mitad de los alimentos producidos en el mundo se pierden a causa de la dispersión de dichos patógenos (Ellis & Boehm, 2008; Cotes, 2018).

## Agentes de control biológico

Como se mencionó anteriormente, también existen microorganismos que están involucrados en un número considerable de procesos benéficos para las plantas hospederas. Gracias a su participación aumenta la disponibilidad de nutrientes esenciales para su crecimiento, la producción de fitohormonas se ve favorecida y la resistencia a enfermedades también incrementa (Qu et al., 2020). Varios microorganismos benéficos han sido reportados por su capacidad para producir compuestos volátiles y no volátiles o de desarrollar mecanismos de acción que contrarrestan el aumento de otros microorganismos clasificados como patógenos (Abd-Elgawad, 2020; Fira et al., 2018; Junior et al., 2020; Liu et al., 2013). Los microorganismos empleados para tal fin son denominados agentes de control biológico y han sido identificados y empleados para el desarrollo de bioproductos (bioinsumos) que puedan ser integrados dentro de estrategias de manejo más amigables con el medio ambiente para disminuir el uso de productos de síntesis química.

En Colombia, hasta diciembre de 2019, se encontraban registrados ante el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) 326 bioinsumos clasificados en: inoculantes de uso agrícola (96), agentes de control biológico de plagas y enfermedades (226) y un bioinsumo registrado con los dos modos de acción. Dentro de los principales agentes de control biológico empleados se registran varias especies de *Bacillus* spp., *Pseudomona aureofaciens*, *Streptomyces racemochromogenes*, *Burkholderia cepacia* y diversas especies de *Trichoderma* spp. Los agentes de control biológico mencionados están recomendados para el control de *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria solani*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum* y *Pseudomonas syringae*, entre otros (tabla 3.2) (ICA, 2019).

**Tabla 3.2.** Principales agentes de control biológico de bioinsumos registrados ante el ICA hasta diciembre de 2019 para el control de fitopatógenos

| Agente de control biológico                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Patógeno / Cultivo                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><i>Bacillus subtilis</i></p> <p>Reino: Bacteria<br/>Filum: Firmicutes<br/>Clase: Bacilli<br/>Orden: Bacillales<br/>Familia: Bacillaceae<br/>Género: <i>Bacillus</i><br/>Especie: <i>B. subtilis</i> (Ehrenberg 1835)<br/>Cohn (1872)</p>                                                                    | <p><i>B. cinerea</i> / Rosa<br/><i>R. solani</i> / Arroz<br/><i>solani</i> / Tomate<br/><i>P. syringae</i> / Tomate<br/><i>Ramularia areola</i> / Algodón<br/><i>M. fijiensis</i> / Banano<br/><i>F. oxysporum</i> / Piña<br/><i>P. cinnamomi</i> / Piña<br/><i>P. cinnamomi</i> / Piña<br/><i>C. gloeosporioides</i> / Aguacate<br/><i>C. acutatum</i> / Aguacate</p>                                                                                                                                                                                                                  |
| <p><i>Burkholderia cepacia</i></p> <p>Reino: Bacteria<br/>Filum: Proteobacteria<br/>Clase: Betaproteobacteria<br/>Orden: Burkholderiales<br/>Familia: Burkholderiaceae<br/>Género: <i>Burkholderia</i><br/>Especie: <i>B. cepacia</i> complex<br/>(Palleroni &amp; Holmes 1981)<br/>Yabuuchi et al. (1993)</p> | <p><i>B. cinerea</i> / Pompón</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <p><i>Trichoderma harzianum</i></p> <p>Reino: Hongo<br/>División: Ascomycota<br/>Subdivisión: Pezizomycotina<br/>Clase: Sordariomycetes<br/>Orden: Hypocreales<br/>Familia: Hypocreaceae<br/>Género: <i>Trichoderma</i><br/>Especie: <i>T. harzianum</i><br/>Rifai (1969)</p>                                  | <p><i>Fusarium</i> sp. / Clavel, tomate<br/><i>Fusarium roseum</i> / Clavel<br/><i>F. oxysporum</i> / Clavel, hortalizas y aromáticas<br/><i>R. solani</i> / Arroz, Pompom, soya, tomate, crisantemo, café<br/><i>R. areola</i> / Algodón<br/><i>B. cinerea</i> / Tomate, pepino, uva, cítricos, haba, rosa, fresa, tomillo<br/><i>Sclerotinia sclerotiorum</i> / Pompón, clavel<br/><i>Phytophthora</i> spp. / Aguacate, tomillo, romero, vainilla, estragón, oregano, café, gulupa, tomate, uchuva, lulo, tomate de árbol, ají, pimentón, berenjena<br/><i>A. solani</i> / Tomate</p> |

(Continúa)

(Continuación tabla3.2)

| Agente de control biológico                                                                                                                                                                                                                                                            | Patógeno / Cultivo                                                                                                                                                                                         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Trichoderma lignorum</i><br><br>Reino: Hongo<br>División: Ascomycota<br>Subdivisión: Pezizomycotina<br>Clase: Sordariomycetes<br>Orden: Hypocreales<br>Familia: Hypocreaceae<br>Género: <i>Trichoderma</i><br>Especie: <i>T. lignorum</i> (Tode) Harz (1871)                        | <i>F. oxysporum</i> / Clavel<br><i>Fusarium oxysporum</i> sp. Lycopersici / Tomate<br><i>R. solani</i> / Arroz                                                                                             |
| <i>Trichoderma koningii</i><br><br>Reino: Hongo<br>División: Ascomycota<br>Subdivisión: Pezizomycotina<br>Clase: Sordariomycetes<br>Orden: Hypocreales<br>Familia: Hypocreaceae<br>Género: <i>Trichoderma</i><br>Especie: <i>T. koningi</i> Oudem (1902)                               | <i>R. solani</i> / Pompon, arroz, café<br><i>Phytophthora</i> spp. / Aguacate, tomillo, romero, vainilla, estragon, oregano, café, gulupa, tomate, uchuva, lulo, tomate de árbol, ají, pimentón, berenjena |
| <i>Trichoderma koningiopsis</i><br><br>Reino: Hongo<br>División: Ascomycota<br>Subdivisión: Pezizomycotina<br>Clase: Sordariomycetes<br>Orden: Hypocreales<br>Familia: Hypocreaceae<br>Género: <i>Trichoderma</i><br>Especie: <i>T. koningiopsis</i><br>Samuels, Suárez & Evans (2006) | <i>F. oxysporum</i> / Tomate                                                                                                                                                                               |

(Continúa)

(Continuación tabla 3.2)

| Agente de control biológico                                                                                                                                                                                                                                                                           | Patógeno / Cultivo                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><i>Trichoderma atroviride</i></p> <p>Reino: Hongo<br/>División: Ascomycota<br/>Subdivisión: Pezizomycotina<br/>Clase: Sordariomycetes<br/>Orden: Hypocreales<br/>Familia: Hypocreaceae<br/>Género: <i>Trichoderma</i><br/>Especie: <i>T. atroviride</i> P. Karst. (1892)</p>                       | <p>Fitopatógenos sin especificar<br/><i>R. solani</i> / Crisantemo</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <p><i>Trichoderma viride</i></p> <p>Reino: Hongo<br/>División: Ascomycota<br/>Subdivisión: Pezizomycotina<br/>Clase: Sordariomycetes<br/>Orden: Hypocreales<br/>Familia: Hypocreaceae<br/>Género: <i>Trichoderma</i><br/>Especie: <i>T. viride</i> Pers. (1794)</p>                                   | <p><i>R. solani</i> / Pompón, arroz<br/><i>Phytophthora</i> spp. / Aguacate, tomillo, romero, vainilla, estragon, oregano, café, gulupa, tomate, uchuva, lulo, tomate de árbol, ají, pimentón, berenjena<br/><i>Sclerotinia sclerotium</i> / Lechuga<br/><i>B. cinerea</i> / Lechuga<br/><i>Bipolaris oryzae</i> / Arroz<br/><i>Sarocladium oryzae</i> / Arroz<br/><i>Gaeumannomyces graminis</i> / Arroz<br/><i>Helminthosporium oryzae</i> / Arroz</p> |
| <p><i>Trichoderma asperellum</i></p> <p>Reino: Hongo<br/>División: Ascomycota<br/>Subdivisión: Pezizomycotina<br/>Clase: Sordariomycetes<br/>Orden: Hypocreales<br/>Familia: Hypocreaceae<br/>Género: <i>Trichoderma</i><br/>Especie: <i>T. asperellum</i> Samuels, Lieckf &amp; Nirenberg (1999)</p> | <p><i>R. solani</i> / Crisantemo</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

(Continúa)

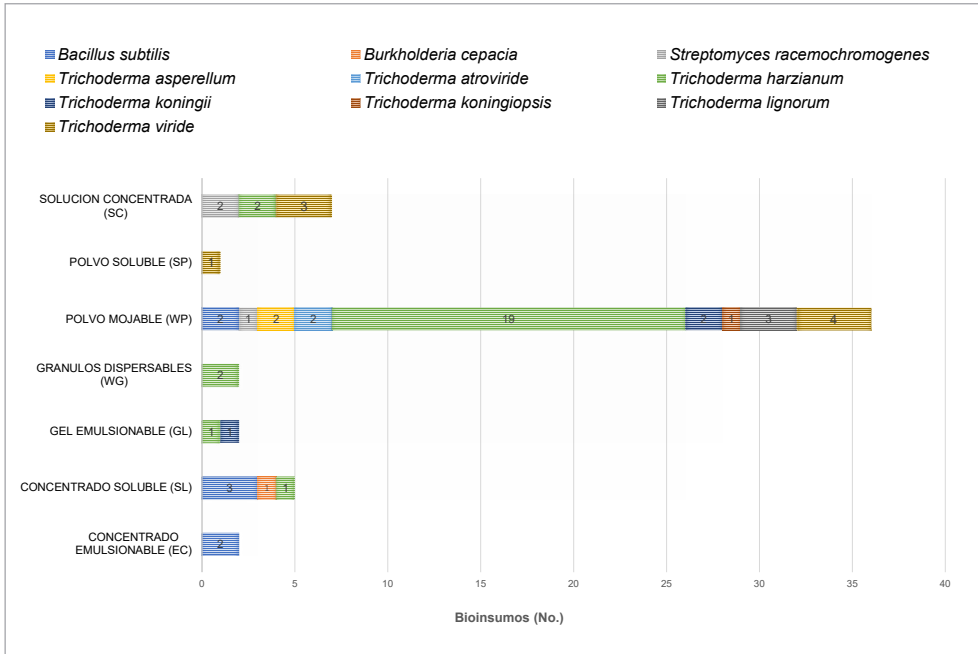
(Continuación tabla 3.2)

| Agente de control biológico                                                                                                                                                                                                                                          | Patógeno / Cultivo                                                            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Streptomyces racemochromogenes</i><br><br>Reino: Bacteria<br>Filum: Actinobacteria<br>Clase: Actinobacteria<br>Orden: Actinomycetales<br>Familia: <i>Streptomycetaceae</i><br>Género: <i>Streptomyces</i><br>Especie: <i>S. racemochromogenes</i><br>Sugai (1956) | <i>Burkholderia glumae</i> / Arroz<br><i>Pseudomonas fuscavaginae</i> / Arroz |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i><br><br>Reino: Hongo<br>División: Ascomycota<br>Clase: Saccharomycetes<br>Orden: Saccharomycetales<br>Familia: Saccharomycetaceae<br>Género: Saccharomyces<br>Especie: <i>S. cerevisiae</i><br>Meyen ex E.C. Hansen                   | <i>Alternaria</i> sp. / Cebolla                                               |

Fuente: Elaboración propia

## Tipos de formulaciones

La formulación de los microorganismos es un paso esencial durante el desarrollo de un bioinsumo viable y efectivo, así como la producción y obtención de las estructuras que van a ser empleadas como ingredientes activos (Glare & Moran, 2016). En cuanto a los bioinsumos registrados ante el ICA como agentes de control, en su mayoría corresponden a formulaciones tipo polvo mojable (WP), seguidas de suspensiones o soluciones concentradas (SC) y concentrado soluble (SL), entre otros (figura 3.1). Los principales ingredientes activos corresponden a: esporas o conidios, seguidos de clamidosporas y en menor cantidad células. Es importante tener en cuenta esta información para realizar una adecuada reconstitución de los bioinsumos y garantizar una mayor recuperación de dichas estructuras viables.



**Figura 3.1.** Principales tipos de formulación e ingredientes activos de bioinsumos registrados ante el ICA hasta diciembre de 2019 para el control de fitopatógenos.

Fuente: Elaboración propia

## Criterios para la elaboración de los controles de calidad y evaluación de la eficacia

Saber qué criterios seguir para determinar si un bioinsumo cumple con los requisitos establecidos para la obtención del registro de productor y su comercialización es un paso clave dentro del proceso de evaluación. A continuación, se presentan algunos aspectos que se deben tener en cuenta para llevar a cabo un correcto control de calidad.

### Reconstitución de los bioproductos

La rehidratación es un factor crítico que se debe tener en cuenta para la evaluación de la eficacia de los bioproductos formulados como polvos mojables, gránulos dispersables o los inmovilizados en matrices poliméricas. El proceso de reconstitución consta de 4 pasos: humectación, inmersión, dispersión y disolución (si es soluble). Dependiendo de la manera en que se realice la reconstitución, se garantiza la viabilidad y reactivación de las células o estructuras formuladas (Freudig, 1999;

Morgan et al., 2006; Muller et al., 2010). Adicionalmente, durante este paso también se deben tener en cuenta dos aspectos importantes, a saber: el vehículo de hidratación —el cual podría facilitar la reparación de posibles daños causados durante la formulación, la restauración de las funciones fisiológicas y garantizar su actividad biológica— y el efecto de la temperatura, el pH, la osmolaridad, el volumen y el tiempo de rehidratación (Carbó et al., 2017; Muller et al., 2010). Dentro de las soluciones empleadas para la rehidratación de productos se recomiendan las siguientes (Aguirre et al., 2018; Carbó et al., 2017; Morgan et al., 2006):

- Agua destilada
- Solución salina 0,9 %
- Glucosa anhidrida
- Leche descremada (100 g/L)
- Tween 80

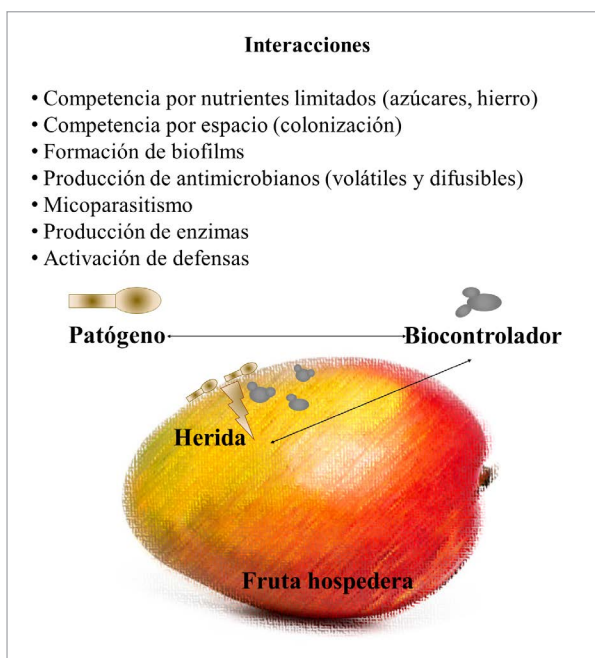
Según estudios realizados por Carbó et al. (2017), se sugiere que el tiempo de hidratación sea de 10 minutos como mínimo y de 2 horas como máximo. Sin embargo, cabe aclarar que el tiempo de hidratación puede aumentar según el tipo de formulación desarrollada, que puede establecer cada productor mediante procesos de caracterización del producto.

## **Características y mecanismos de acción de los agentes de control biológico**

Como se mencionó anteriormente en este apartado, para evaluar la actividad biológica de un bioinsumo sobre un patógeno determinado es necesario tener en cuenta las características de los diferentes tipos de microorganismos: el microorganismo antagonista, el microorganismo patógeno y las condiciones requeridas para su desarrollo e interacción. Dado que la mayoría de estas evaluaciones se realizan bajo condiciones controladas en un laboratorio (*in vitro*), es indispensable conocer las características macroscópicas y microscópicas de los microorganismos evaluados en diferentes medios de cultivo o sustratos empelados para su evaluación.

Otro parámetro importante para la correcta evaluación de los bioinsumos es conocer los mecanismos de control biológico empleados por los agentes de control. Los meca-

nismos de acción ejercidos por parte del biocontrolador sobre el patógeno de la planta se dividen en directos e indirectos (figura 3.2). Dentro de los mecanismos directos encontramos: la competencia por nutrientes y espacio, la producción de antibióticos, la producción de enzimas líticas, la inactivación de enzimas producidas por el patógeno y el parasitismo. Dentro de los mecanismos indirectos se incluyen todos aquellos que tienen la capacidad de causar un cambio morfológico o bioquímico en la planta hospedera como, por ejemplo, el desarrollo de tolerancia por parte de la planta hospedera, la solubilización o captura de nutrientes inorgánicos o la activación del sistema de resistencia inducida (De Almeida et al., 2015; Viterbo et al., 2002).



**Figura 3.2.** Interacciones entre microorganismos patógenos y agentes biocontroladores (mecanismos de acción).

Fuente: Elaboración propia

## Aplicación de los bioinsumos y microorganismos patógenos

Garantizar que el patógeno esté activo para evaluar la actividad biológica de un biocontrolador es un paso indispensable que se debe garantizar al momento de realizar el ensayo. El patógeno debe estar activo y debe evidenciar signos o características típicas de su crecimiento para su uso. Se debe emplear una dosis de inoculación que garantice la producción de la enfermedad como, por ejemplo, cuando la

evaluación se realiza sobre frutos. La aplicación del bioinsumo y del patógeno se puede realizar de las siguientes maneras:

- **Aspersión:** la inoculación por aspersión consiste, como su nombre lo indica, en rociar el ingrediente activo (conidios o células) de manera homogénea sobre el sustrato empleado para la evaluación; ya sea en el medio de cultivo o en los frutos. Se debe tener en cuenta el volumen a inocular, la concentración final del inóculo y verificar que la totalidad de la superficie donde se va a realizar la evaluación quede cubierta con la muestra.
- **Inoculación por gota:** para que sea más precisa, la inoculación por gota se puede realizar mediante una micropipeta. En su defecto, se puede emplear una pipeta Pasteur. Al igual que con la inoculación por aspersión, se debe tener en cuenta el volumen, la concentración y que la gota no se vaya a regar o expandir.
- **Inmersión:** la mayoría de los ensayos *in vivo* emplean frutos para determinar la actividad antagonica de un biocontrolador. En estos casos la inoculación del patógeno o el biocontrolador se realiza mediante la inmersión de los frutos durante unos segundos en la suspensión realizada del patógeno o en la suspensión reconstituida del bioproducto. Una vez se deja secar la muestra sobre el fruto se incuban a las condiciones respectivas.

## Parámetros de evaluación de la actividad biológica

La capacidad de un patógeno para desarrollar la enfermedad depende de la cepa empleada; las condiciones del cultivo; la edad del cultivo; las dosis seleccionada o recomendada; el sustrato de evaluación; la uniformidad de la forma de inoculación y las condiciones ambientales como humedad, pH, temperatura, entre otras (French, 1982). La separación de los propágulos o células patogénicas a partir de un medio sólido se puede realizar mecánicamente a partir del crecimiento superficial. Para el caso de los hongos, si se requieren solo los conidios, se puede pasar la suspensión del patógeno a través de muselina estéril para retener partes de micelio y dejar pasar solo los conidios. Posteriormente, la concentración de conidios (ya filtrados) se ajusta por recuento en cámara de Neubauer en un microscopio óptico (objetivo 40×). En muchas ocasiones, para el caso de células bacterianas, se puede ajustar la suspensión empleando una escala de referencia de McFarland o haciendo una lectura de la absorbancia en una longitud de onda de recomendada (según el tamaño del microorganismo) (Tan et al., 2013).

En las evaluaciones que implican el uso de un patosistema (frutos, hojas, tallos o pétalos), es indispensable saber cómo diagnosticar y distinguir adecuadamente un signo de un síntoma, así como entre incidencia y severidad. Los signos indican enfermedad por observación directa de un patógeno o sus partes (hifa, conidio, cuerpos fructíferos, entre otros), mientras que los síntomas indican enfermedad por reacción del huésped, que se evidencia por la coloración anormal de los tejidos o por pudrición (Ellis & Boehm, 2008).

En cuanto a la incidencia y severidad; la incidencia hace referencia a la proporción o número de unidades de una muestra u otra población definida (plantas, frutos, hojas) en las que está presente una plaga o fitopatógeno (Convención Internacional de Protección Fitosanitaria [CIPF], 2016). En la mayoría de las evaluaciones la incidencia es expresada como un porcentaje del total del número de muestras infectadas, por lo cual es una variable mucho más fácil y rápida de medir comparada con la severidad. Por otro lado, la severidad es un término utilizado para caracterizar el impacto que tiene el proceso de la enfermedad sobre los tejidos de un individuo (fruto u hoja, por ejemplo). En otras palabras, la severidad hace referencia al área o volumen de tejido afectado y se determina empelando escalas de clasificación del avance de la enfermedad (Seem, 1984).

## **Aceptación o rechazo de bioinsumo**

Si tras una evaluación bajo las indicaciones descritas por la casa comercial o las metodologías estandarizadas por el laboratorio encargado el bioinsumo no cumple con las especificaciones establecidas, el producto se debe rechazar. En caso de existir discrepancias, se debe repetir el ensayo con las muestras reservadas para tal fin (contramuestras).

## **Material de referencia**

Las cepas de referencia son microorganismos viables obtenidos de una colección nacional o internacional. Si las cepas control corresponden a aislamientos propios del investigador, estas deben estar caracterizadas morfológicamente, por pruebas bioquímicas y debidamente identificadas molecularmente. La conservación de estos microorganismos debe garantizar su pureza y estabilidad microbiológica porque son los que se emplean como tratamientos control o de contraste en los ensayos de eficacia. Es indispensable que las cepas empleadas como cepas control cuenten con el certificado de procedencia e identidad.

## Metodologías

La evaluación de la actividad antagónica de un microorganismo empleado como ingrediente activo de un bioinsumo tiene como fin proporcionar información confiable acerca de su eficacia. En consecuencia, la elección de un método de ensayo adecuado es crucial, así como la selección de los materiales, los medios de cultivo, el tipo de ensayo, las variables a evaluar y las condiciones ambientales del área donde se va a realizar el ensayo. Se recomienda que la selección del método de evaluación y el análisis estadístico se realice según el microorganismo en estudio.

Para la evaluación de la actividad antagónica se pueden emplear métodos nacionales o internacionales normalizados o métodos internos desarrollados y estandarizados por el laboratorio. Estos deben garantizar resultados confiables en cuanto a equivalencia (unidades de medición) y trazabilidad.

A continuación se describen 13 metodologías —en su mayoría tomadas de bibliografía especializada— que se pueden emplear como modelo para la estandarización de protocolos de evaluación de la actividad antagónica de diferentes agentes de control biológico (bacterias y hongos). Las metodologías descritas a continuación, se seleccionaron para que puedan ser llevadas a cabo bajo condiciones *in vitro*; haciendo uso de cajas de Petri, tubos de ensayo o montaje de patosistemas de evaluación, seleccionando frutos susceptibles (todos bajo condiciones controladas).

### Metodología I

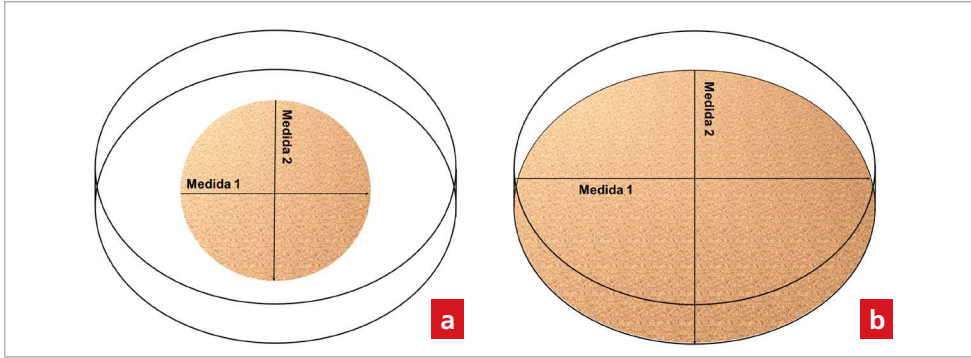
**Patógeno modelo:** *Colletotrichum gloeosporioides*

**Biocontrolador:** *Levadura* (ej: *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula glutinis*, *Pichia onichys*)

**Técnica:** *Enfrentamiento*

Se inocula un volumen de 0,5 ml del bioproducto reconstituido en agua y ajustado a una concentración de  $1 \times 10^7$  células/ml de la levadura en el centro de una caja de Petri que contiene un medio de papa dextrosa agar PDA. Se homogeneiza sobre la superficie del medio con ayuda de un rastrillo estéril. La muestra se deja secar durante aproximadamente 1 hora dentro de una cabina de flujo laminar. El patógeno *C. gloeosporioides* se inocula en el centro de la caja de Petri, para lo cual se toman 0,5 ml de la suspensión ajustada a una concentración de  $1 \times 10^5$  esporas/ml. Las cajas se incuban a  $25 \pm 1$  °C durante 8 días, periodo después del cual se toman dos

medidas perpendiculares del diámetro de la colonia, las cuales se promedian para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento diametral mediante la ecuación 3.1 (figura 3.3) (Aguirre et al., 2019).



**Figura 3.3.** Medidas perpendiculares del diámetro de la colonia. a. Enfrentamiento entre el agente biocontrolador y el fitopatógeno; b. Crecimiento del fitopatógeno sin presencia del agente biocontrolador.

Fuente: Elaboración propia

$$Inhibición(\%) = \left( \frac{DCP - DCE}{DCP} \right) \times 100$$

**Ecuación 3.1.** Inhibición de crecimiento diametral (%). Elaboración propia.

Donde:

DCP: Diámetro de la colonia del testigo patógeno (mm)

DCE: Diámetro de la colonia del ensayo (mm)

El diseño experimental es completamente al azar. Se debe contar con un tratamiento control que consiste en la inoculación del patógeno sin presencia del bioproducto (levadura) y la inoculación del bioproducto sin inoculación del patógeno *C. gloeosporioides*.

## Metodología II

**Patógeno modelo:** *Thielaviopsis* sp.

**Biocontrolador:** *Trichoderma asperellum*

**Técnica:** *Enfrenamiento en suelo*

Para evaluar la eficacia de un bioproducto formulado a base de un hongo como *Trichoderma* spp., se puede emplear la metodología descrita por Wijesinghe et al.

(2011). Para la evaluación se emplean tubos de ensayo estériles de 25 mm de diámetro por 145 mm de longitud y suelo previamente tamizado a través de una malla de 25 cm<sup>2</sup>, seco y con un pH ajustado a 4,6 (el pH puede variar según el patógeno a evaluar y el cultivo al cual va dirigido el producto). Una muestra de 20 g de suelo se introduce dentro de cada tubo de ensayo y se esteriliza por 2 horas seguidas a 15 psi y 120 °C. Finalizado el proceso, el suelo se deja secar a temperatura ambiente.

Para la evaluación de la eficacia, el suelo estéril debe ser inoculado con 2 ml de una suspensión de  $1 \times 10^5$  conidios/ml de *Thielaviopsis* sp., que se incuban durante 7 días a  $28 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ . Se debe verificar la presencia del patógeno en el suelo inoculado mediante la selección de algunos tubos al azar, la evaluación de la viabilidad y la determinación de la concentración mediante la técnica de recuento en placa. Una vez confirmada la presencia del patógeno en el suelo, se adicionan a cada tubo del experimento 10 ml del bioproducto reconstituido siguiendo las indicaciones del fabricante; al final debe verificarse la concentración final del principio activo. Los tubos inoculados se incuban durante 8 semanas a temperatura ambiente ( $19 \text{ °C}$  a  $20 \text{ °C}$ ) y una vez por semana (cada 8 días) se deben adicionar 5 ml de agua destilada estéril a cada uno de los tubos bajo condiciones de esterilidad para mantener la humedad del suelo. La eficacia del producto debe ser evaluada cada semana y expresada como disminución de las UFC del patógeno.

El ensayo debe contar con un control absoluto (suelo inoculado solo con agua), un control del patógeno (suelo inoculado con el patógeno y con 10 ml de agua estéril) y un control del biocontrolador (suelo inoculado solo con el bioproducto, se debe mantener la proporción de los volúmenes finales).

El diseño experimental es completamente al azar. La unidad experimental constará de un tubo con 3 réplicas y todo el ensayo se repetirá 3 veces en el tiempo.

### Metodología III

**Patógeno modelo:** *Ralstonia solanacearum*

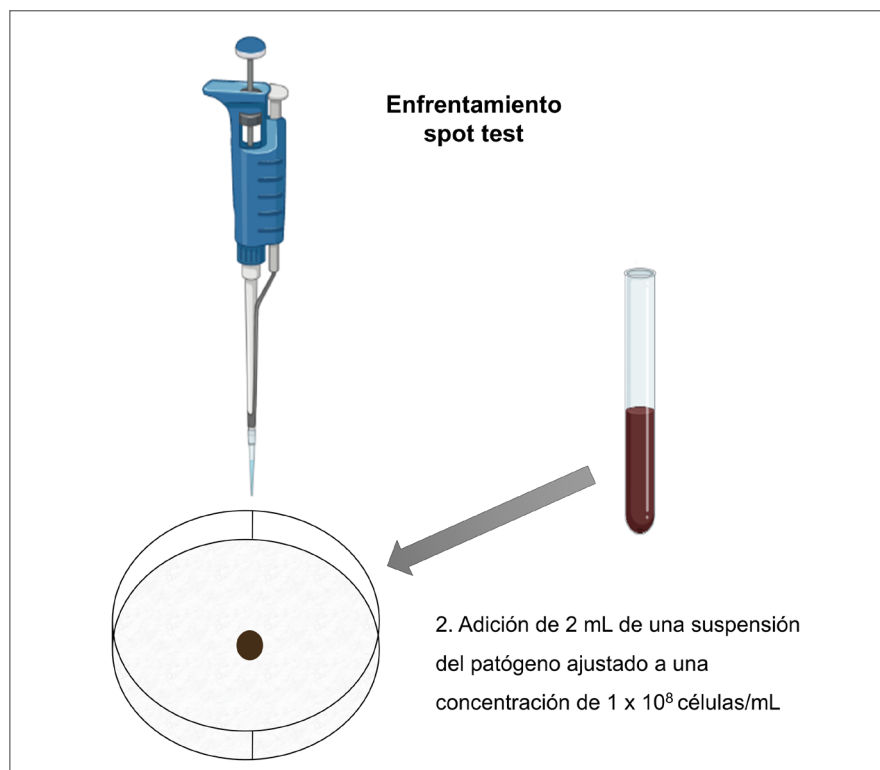
**Biocontrolador:** *Bacillus* spp. o *Pseudomonas* spp.

**Técnica:** Spot Test

No son muchas las metodologías empleadas para la evaluación de la eficacia de productos a base de bacterias bajo condiciones *in vitro*. Sin embargo, a continuación se proponen dos metodologías de *Spot Test* para determinar la eficacia de los bioinsumos frente a patógenos como, por ejemplo, *R. solanacearum* u otros (Ge et al., 2017; Ryan et al., 2004; Tan et al., 2013).

En la metodología descrita por Tan et al. (2013), la evaluación se realiza en un medio de agar Luria Bertani (LB) y King B (KB). El bioinsumo, cuyo principio activo es una bacteria, se debe reconstituir siguiendo la metodología descrita por el fabricante; asimismo, el bioinsumo se debe ajustar a una concentración de 1,0 ( $OD_{600}=1,0$ ) empleando una escala de McFarland o un espectrofotómetro (600 – 630 nm). A partir de la muestra reconstituida, se inoculan 2  $\mu$ l en el centro de las cajas de Petri que contengan el agar (LB y KB). Las cajas inoculadas con el biocontrolador se incuban durante 36 horas a  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Finalizado el periodo de incubación, se debe evidenciar el crecimiento característico de la bacteria a evaluar sobre las cajas de Petri. Posteriormente, bajo condiciones de esterilidad se adicionan 2 ml de una suspensión de  $1 \times 10^8$  células/ml del patógeno, que en este caso corresponde a *R. solanacearum*. Las cajas inoculadas se dejan secar y se incuban nuevamente durante 48 horas a  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  (figura 3.4).

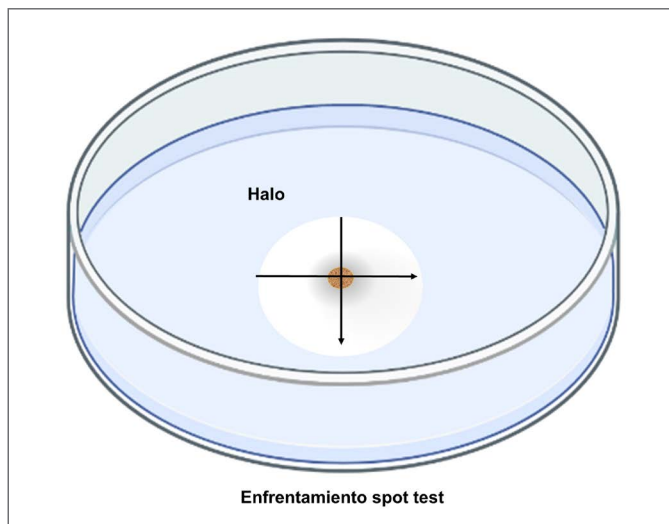
El ensayo debe contar con un control patógeno (el cual corresponde a las cajas inoculadas solo con la suspensión de *R. solanacearum* sin presencia del agente biocontrolador) y un control positivo (que corresponde a las cajas inoculadas solo con el bioinsumo). Mediante un calibrador digital, la actividad antimicrobiana se determina midiendo el halo de inhibición (mm) formado alrededor de la colonia del agente biocontrolador. La unidad experimental del ensayo corresponde a una caja de Petri. Debe contar con 3 réplicas por tratamiento y 3 repeticiones en el tiempo.



**Figura 3.4.** Técnica de enfrentamiento entre el agente biocontrolador y la bacteria fitopatógena.

Fuente: Elaboración propia

Otra metodología propuesta para evaluar la eficacia del principio activo de un bioinsumo a base de bacterias es la descrita por Ge et al. (2017), con algunas modificaciones. Al igual que en las metodologías anteriores, el producto debe reconstituirse siguiendo las especificaciones de la casa comercial. Para este caso, se toman 10  $\mu$ l del bioinsumo reconstituido y se inoculan en el centro de una caja de Petri con agar LB. Las cajas inoculadas se incuban durante 24 horas a 30 °C. Finalizado el periodo de incubación se debe verificar el crecimiento característico del agente biocontrolador y, bajo condiciones de esterilidad, se debe adicionar una suspensión del patógeno ajustado a una concentración de  $1 \times 10^2$  células/ml (menor concentración en comparación con la metodología anterior). Las cajas se incuban nuevamente durante 24 horas a 30 °C  $\pm$  1 °C. El efecto antagonista se determina midiendo el halo de inhibición formado alrededor de la colonia del agente biocontrolador con ayuda de un calibrador digital (figura 3.5).



**Figura 3.5.** Medición del halo de inhibición causado por el enfrentamiento del agente biocontrolador y la bacteria fitopatógena. Se pueden tomar dos medidas perpendiculares y promediarlas.

Fuente: Elaboración propia

La unidad experimental es una caja de Petri. El ensayo cuenta con 3 réplicas y se realiza 3 veces en el tiempo. Como testigo patógeno se inocula *R. solanacearum* sin presencia del biocontrolador. Como control positivo se inocula el biocontrolador sin presencia del patógeno.

En la metodología descrita por Ryan et al. (2004) se propone una modificación en la forma de inocular el microorganismo patógeno. Una vez se haya reconstituido el bioinsumo, 10 µl de la muestra se inoculan en el centro de una caja de Petri con Agar LB. Las cajas inoculadas se deben incubar durante 24 o 48 horas (según el agente biocontrolador) a  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, y a diferencia de las metodologías descritas anteriormente en este apartado, se deben adicionar sobre el medio LB 15 ml de agar agua semisólido (AASS) de manera tal que cubra la totalidad de la superficie. Una vez se haya gelificado el AASS, se inocula el patógeno sobre toda la superficie del medio mediante la aspersión de una suspensión de  $1 \times 10^6$  células por ml. Las cajas se incuban nuevamente durante 24 o 48 horas (según corresponda) a  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Finalizado el periodo de incubación, se debe determinar el efecto antagonista midiendo el halo de inhibición formado alrededor de la colonia del agente biocontrolador. El patógeno también se puede inocular mediante el ajuste de la concentración de manera directa en el AASS para, posteriormente, adicionarlo sobre el medio LB inoculado con el biocontrolador.

El diseño experimental es completamente al azar. La unidad experimental es una caja de Petri. El ensayo debe contar con 3 réplicas y realizarse 3 veces en el tiempo. Igualmente, se debe contar con controles que validen el crecimiento del microorganismo patógeno, así como el del agente biocontrolador.



Foto: Liz Alejandra Uribe

**Figura 3.6.** Halo de inhibición causado por el enfrentamiento entre el agente biocontrolador y la bacteria fitopatógena inoculada mediante la adición de agar semisólido.

## Metodología IV

**Patógeno modelo:** *Ralstonia solanacearum*

**Biocontrolador:** *Pseudomonas aeruginosa*

**Técnica:** *Difusión en agar*

La metodología de difusión en agar también puede ser empleada para la evaluación de la actividad biológica de un agente de control biológico. En la metodología descrita por Lemessa & Zeller (2007), 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión del patógeno, que en este caso es *R. solanacearum* ajustado a  $1 \times 10^8$  células/ml, se aplican sobre la superficie del medio de cultivo LB. Una vez la muestra esté seca, se abren 4 pozos de 9 mm cada uno sobre la superficie del medio evitando llegar hasta el fondo (se puede servir una capa de medio que sirva como base). En cada pozo se adicionan 30  $\mu\text{l}$  del bioinsumo reconstituido. Las cajas inoculadas se incuban durante 48 horas a 28 °C. La actividad antimicrobiana se evalúa midiendo los halos de inhibición formados

alrededor de las colonias del agente biocontrolador empleando un calibrador digital (Lemessa & Zeller, 2007).

El diseño experimental es completamente al azar. La unidad experimental es una caja de Petri. El ensayo debe contar con 3 réplicas y realizarse 3 veces en el tiempo. Como testigo patógeno se debe inocular *R. solanacearum* sin presencia del biocontrolador. Como control positivo se debe inocular el biocontrolador sin presencia del patógeno.

## Metodología V

**Patógeno modelo:** *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*

**Biocontrolador:** *Pseudomonas aeruginosa*

**Técnica:** Inhibición del crecimiento micelial mediante la determinación de peso seco (g)

Con la siguiente metodología se puede evaluar la eficacia de un bioinsumo a base de bacterias para inhibir el crecimiento de un patógeno como *Fusarium* spp. En este caso, en la metodología descrita por Trivedi et al. (2008), se emplea la técnica de enfrentamiento y la eficacia se determina mediante la capacidad de la bacteria de inhibir el crecimiento del patógeno, tomando la medida del peso seco (g) después de un proceso de fermentación en medio líquido. Para esto, se realiza la reconstitución del bioinsumo siguiendo las recomendaciones de la casa comercial y se ajusta a la concentración recomendada. Erlenmeyers de 250 ml que contienen 50 ml de PDA (o el medio recomendado) son inoculados con 1 ml del bioproducto reconstituido (ajustado a la concentración a evaluar) y un disco de agar de PDA de 5 mm con el patógeno crecido. Los Erlenmeyer inoculados son incubados durante 72 horas a 28 °C con agitación continua de 80 rpm. Finalizado el periodo de incubación, el caldo fermentado se pasa a través de papel filtro (No. 1 figura 3.3). Cada papel filtro es secado durante 24 horas a 70 °C y, posteriormente, se toma el dato del peso (g) en una balanza analítica. El porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno se determina empleando la ecuación 3.2.

$$\text{Inhibición(\%)} = \left( \frac{(W1 - Wc) - (W2 - Wc)}{(W1 - Wc)} \right) \times 100$$

**Ecuación 3.2.** Inhibición (%) para la metodología de crecimiento micelial por peso seco (Trivedi et al., 2008).

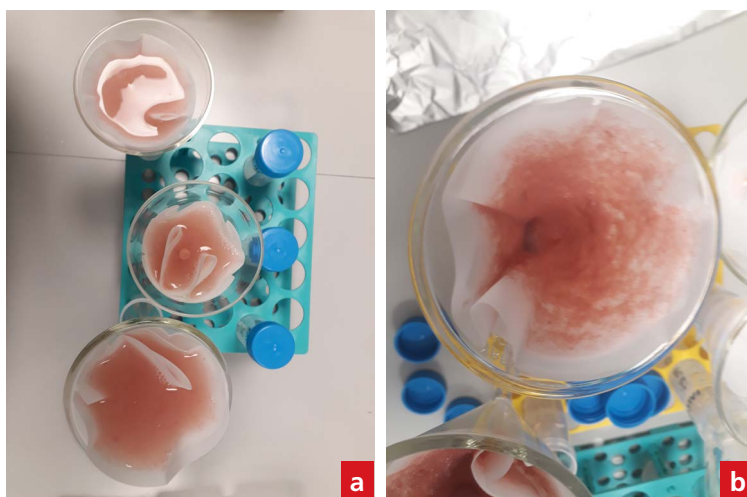
Donde:

W1: Peso seco (g) de tratamientos testigo patógeno

W2: Peso seco (g) del tratamiento inoculado con bacterias

Wc: Peso seco (g) del testigo (agua estéril)

El diseño experimental es completamente al azar. La unidad experimental consiste en un Erlenmeyer que contiene 50 ml de PDA. El ensayo debe contar con 3 réplicas y debe realizarse 3 veces en el tiempo. Como testigo patógeno se debe inocular *Fusarium* spp. (W1) sin presencia del biocontrolador. Como control positivo se debe inocular el biocontrolador sin presencia del patógeno (para verificar viabilidad). Como testigo absoluto (Wc) se debe emplear agua destilada estéril (sin inocular).



Fotos: Liz Alejandra Uribe Gutiérrez

**Figura 3.7.** Inhibición del crecimiento micelial mediante la determinación de peso seco (g). a. Filtración del medio de fermentación a través de papel Whatman No. 1; b. Obtención de biomasa húmeda.

## Metodología VI

**Patógeno modelo:** *Geotrichum* sp. – *M. fructicola*

**Biocontrolador:** *Metschnikowia citriensis* – *Pichia membranaefaciens* – *Kloeckera apiculata*

**Técnica:** *Enfrentamiento*

Para evaluar la eficacia bajo condiciones *in vitro* de un bioinsumo cuyo ingrediente activo sea una levadura, se pueden emplear las metodologías descritas por Wang et al. (2020) y Zhang et al. (2017). Se debe realizar la reconstitución del bioinsumo siguiendo las metodologías descritas por la casa comercial y ajustando la concentración final a  $1 \times 10^6$  células/ml. Un volumen de 100  $\mu$ l de la suspensión de levaduras es asperjado sobre la superficie del medio PDA. La muestra se deja secar durante 1 hora y, posteriormente, un disco de agar de 5 mm de diámetro que evidencie crecimiento micelial del patógeno se ubica en el centro de la caja. Se debe tener en cuenta que el lado que evidencie el crecimiento debe quedar en contacto con el medio de cultivo. Las cajas inoculadas se incuban durante 10 días a 25 °C o 28 °C (según el patógeno a evaluar) y cada dos días se toman dos medidas perpendiculares del diámetro de la colonia. Las dos medidas se promedian y se determina el dato de crecimiento radial en el tiempo (mm/días). El porcentaje de inhibición del crecimiento diametral se determina empleando la ecuación 3.1.

El diseño experimental es completamente al azar. La unidad experimental es una caja de Petri con Agar PDA. El ensayo debe contar con 3 réplicas y realizarse 3 veces en el tiempo. Como testigo patógeno se inocula *Geotrichum* sp. en medio PDA asperjado con agua destilada estéril (sin presencia del agente biocontrolador). Como control positivo se inocula el biocontrolador sin presencia del patógeno.

## Metodología VII

**Patógeno modelo:** *Monilinia fruticola*

**Biocontrolador:** *Pichia membranaefaciens* – *Kloeckera apiculata*

**Técnica:** *Inhibición de la germinación*

Zhang et al. (2017) describe una metodología con modificaciones (Ren et al., 2012) que permite determinar la eficacia de un bioinsumo a base de una levadura para inhibir la germinación de un microorganismo patógeno como, por ejemplo, *M. fruticola*. Para esto, se debe realizar la reconstitución del bioinsumo siguiendo las metodologías descritas por la casa comercial y se debe ajustar a la concentración indicada. Un volumen de 1 ml de la suspensión debe ser inoculado en un Erlenmeyer de 50 ml que contenga 8 ml de caldo papa dextrosa (PDB). Asimismo, un volumen de 1 ml de la suspensión del patógeno ajustado a  $5 \times 10^6$  conidios/ml debe ser inoculado en el medio que contenga la levadura. Los Erlenmeyer inoculados deben ser incubados durante 72 horas a  $25 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$  a 80 rpm y cada 24 horas se debe realizar el recuento de 100 conidios germinados y no germinados (por campo óptico) mediante un microscopio óptico con el objetivo 40 $\times$ .

El diseño experimental es completamente al azar. La unidad experimental corresponde a un Erlenmeyer que contiene 50 ml de PDB. El ensayo debe contar con 3 réplicas y realizarse 3 veces en el tiempo. Como testigo patógeno se inocula *Monilia* sp. en medio PDA (sin presencia del agente biocontrolador). Como control positivo se inocula el biocontrolador sin presencia del patógeno.

La eficacia del producto para inhibir la germinación del patógeno se determinará comparando el porcentaje de germinación obtenido en el testigo patógeno con el obtenido en el tratamiento empleando las ecuaciones 3.3 y 3.4 (Ren et al., 2012):

$$\text{Germinación}(\%) = \left( \frac{\text{Conidios germinados}}{\text{Conidios germinados} + \text{Conidios no germinados}} \right) \times 100 \%$$

**Ecuación 3.3.** Germinación (%) de conidios de hongos filamentosos.

$$\text{Inhibición}(\%) = \left( \frac{\text{GTP}(\%) - \text{GT}(\%)}{\text{GTP}(\%)} \right) \times 100$$

**Ecuación 3.4.** Germinación (%) de conidios de hongos filamentosos.

Donde:

GTP (%): Germinación en el tratamiento del testigo patógeno (%)

GTC (%): Germinación en el tratamiento (%)

## Metodología VIII

**Patógeno modelo:** *Sclerotinia sclerotiorum*

**Biocontrolador:** *Trichoderma koningiopsis*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma asperellum*

**Técnica:** Antagonismo

Para determinar la actividad biocontroladora de agentes microbianos a base de *T. koningiopsis*, *T. harzianum* y *T. asperellum* sobre *S. sclerotiorum* en condiciones *in vitro*, se describe la siguiente metodología estandarizada por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioinsumos de AGROSAVIA. La metodología se fundamenta en la infección de esclerocios de *S. sclerotiorum* para evaluar el efecto biocontrolador a través del micoparasitismo interno y externo de las estructuras del patógeno. Al igual que en los procedimientos descritos en este apartado, todo el procedimiento se realiza bajo condiciones de esterilidad.

Previo al montaje, se debe cultivar el patógeno para la obtención de esclerocios mediante la inoculación de bandejas que contienen cebada estéril. Después de 10 a 15 días de incubación a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  se cosechan los esclerocios y se desinfectan con alcohol al 70 % durante 1 minuto seguido de dos lavados sucesivos con agua destilada estéril y, posteriormente, con hipoclorito de sodio al 2 % durante 20 segundos, seguido de tres lavados sucesivos con agua destilada estéril. Finalmente, los esclerocios se dejan secar sobre toallas de papel y se dejan listos para su uso. Simultáneamente, se humedece suelo previamente tamizado a capacidad de campo y se distribuye en cajas de Petri con 35 g en cada una sin compactar el suelo. Las cajas con suelo deben ser esterilizadas a una temperatura de  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 20 psi durante 15 minutos y, posteriormente, se debe verificar que la humedad del suelo estéril se encuentre entre el 15 % y el 40 % mediante una balanza de humedad.

Para la evaluación antagónica del agente biocontrolador se reconstituye el producto siguiendo las indicaciones de la casa comercial y se ajusta a la concentración recomendada. Un total de 5 esclerocios se ubican sobre el suelo estéril de manera equidistante con ayuda de una pinza. Sobre cada esclerocio se adicionan 550  $\mu\text{l}$  de la suspensión del agente microbial y se le coloca la tapa a la caja de Petri. Las cajas se almacenan durante 8 días a  $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  y finalizado el periodo de incubación se determina el número de esclerocios parasitados.

Para validar que los esclerocios hayan sido parasitados por el agente biológico, se determina la viabilidad de los esclerocios del tratamiento control (sin inocular) y los inoculados con el bioinsumo. Para esto, se toman los esclerocios de cada réplica (tres por tratamiento), se desinfectan de la manera descrita anteriormente y se ubican sobre agar agua de manera equidistante. Las cajas con los esclerocios se incuban durante 8 días a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, con ayuda de un estereoscopio se observa el micoparasitismo producido por el agente biocontrolador y se determina el porcentaje de parasitismo empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Parasitismo}(\%) = \left( \frac{a}{b} \right) \times 100$$

**Ecuación 3.5.** Cálculo de parasitismo expresado en porcentaje (%) (AGROSAVIA, 2019a).

Donde:

*a*: es el número de esclerocios parasitados por la réplica.

*b*: es el número total de esclerocios por réplica.

El diseño experimental es completamente al azar. La unidad experimental es una caja de Petri que contiene suelo. El ensayo debe contar con 3 réplicas y realizarse 3 veces en el tiempo. El testigo patógeno corresponde a los esclerocios desinfectados pero sin inocular con el bioinsumo. Como control positivo se inocula el biocontrolador con una cepa de referencia.

## Metodología IX

**Patógeno modelo:** *Fusarium oxysporum*

**Biocontrolador:** *Bacillus amyloliquefaciens*

**Técnica:** Antagonismo

La siguiente metodología permite determinar la actividad biocontroladora de un bioinsumo a base de bacterias como *B. amyloliquefaciens* para el control de hongos patógenos como *Fusarium* spp. El bioinsumo debe reconstituirse siguiendo las indicaciones de la casa comercial y ajustarse a la concentración deseada. Posteriormente, un volumen de 100 µl de la muestra se inocula sobre medio PDA y con ayuda de un rastrillo estéril, la muestra se distribuye sobre toda la superficie del medio y se deja secar bajo condiciones de esterilidad. Un disco de agar de 5 mm o 6 mm con crecimiento del hongo de 8 a 10 días de edad se ubica en el centro de la caja. Las cajas inoculadas se incuban durante 7 a 10 días a 25 °C ± 1 °C y finalizado el periodo de incubación, se toman dos medidas del diámetro de la colonia perpendicularmente con ayuda de un calibrador digital. Para calcular el porcentaje de inhibición se emplea la ecuación 3.6.

$$\text{Inhibición(\%)} = \left( \frac{A - B}{A} \right) \times 100$$

**Ecuación 3.6.** Cálculo de inhibición expresado en porcentaje (%)

Donde:

A es el promedio del crecimiento del tratamiento del testigo patógeno.

B es el promedio de crecimiento del patógeno en interacción con el agente biocontrolador.

El diseño experimental es completamente al azar. La unidad experimental es una caja de Petri con agar papa dextrosa. El ensayo debe contar con 3 réplicas y debe realizarse 3 veces en el tiempo. El testigo patógeno corresponde a la inoculación solo

del microorganismo patógeno sin inocular con el bioinsumo. Como control positivo se inocula el biocontrolador con una cepa de referencia.

## Metodología X

**Patógeno:** *Colletotrichum gloeosporioides*

**Biocontrolador:** *Meyerozyma caribbica*

**Patosistema:** *Frutos de mango*

Para evaluar la eficacia de bioproductos a base de levaduras, se puede emplear la metodología descrita por Aguirre et al. (2018). Para la evaluación *in vivo* se emplean mangos sanos de tamaño y grado de madurez similar (pulpa firme y cáscara verde con superficie amarilla). Los mangos deben desinfectarse durante 2 minutos sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1,5 %. Posteriormente, se lavan con agua estéril, se retiran residuos de hipoclorito de la superficie de la fruta y se dejan secar a temperatura ambiente. Una vez secos, a cada mango se le realizan dos heridas de 2,5 mm de profundidad y 3 mm de ancho con ayuda de un instrumento cortopunzante estéril. Los frutos con heridas son sumergidos durante 10 minutos en el bioproducto reconstituido en agua destilada estéril y se ajusta a la concentración recomendada por la casa comercial.

Los mangos del tratamiento control son sumergidos únicamente en agua estéril. Todos los mangos se dejan secar durante una hora y, posteriormente, son inoculados adicionado 25 µl de una suspensión de *C. gloeosporioides* en cada herida.

Los mangos inoculados son almacenados durante 15 días dentro de cámaras húmedas a 25 °C ± 1 °C y 80 % de humedad. Cada 3 días se mide la incidencia y severidad de la enfermedad. Para dicho fin se toma la medida del diámetro de la colonia y se define utilizando la ecuación 3.7.

$$\text{Incidencia de la enfermedad (\%)} = \left( \frac{\text{No. de frutos con signos y síntomas}}{\text{Total de frutos evaluados}} \right) \times 100$$

**Ecuación 3.7.** Incidencia de *C. gloeosporioides*. (Aguirre et al., 2018).

El diseño experimental es completamente al azar. La unidad experimental es 1 mango con 10 réplicas (10 mangos) y 3 repeticiones en el tiempo. Los tratamientos para evaluar deben incluir: primero, los mangos inoculados con el bioproducto y el patógeno; segundo, los mangos inoculados con el patógeno únicamente; tercero, los

mangos inoculados solo con agua destilada (testigo) y cuarto, los mangos tratados solo con el bioproducto. Si se cuenta con la cepa de referencia se podría incluir en el diseño experimental.

## Metodología XI

**Patógeno:** *Penicillium digitatum*

**Biocontrolador:** *Pichia guilliermondii* y *Candida oleophila*

**Patosistema:** Frutos de naranja o limón

Otros procedimientos que permiten evaluar la eficacia de bioproductos a base de levaduras son los descritos por De Corato et al. (2018) y Wang et al. (2020). Estos consisten en seleccionar frutos sanos de tamaño y madurez similar (preferiblemente no tratados con fungicidas). Los frutos seleccionados deben ser lavados con agua de la llave para retirar la suciedad o los residuos de agroquímicos (si han sido tratados). Los frutos se desinfectan sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) ajustado al 0,3 % durante 3 minutos, seguido de tres lavados sucesivos con agua estéril y se dejan secar a temperatura ambiente (19 °C a 20 °C). A los frutos desinfectados se les deben realizar dos heridas opuestas (a cada lado del fruto) de 2 mm de profundidad y 3 mm de longitud sobre el epicarpo con un instrumento cortopunzante estéril. Los frutos secos correspondientes al tratamiento a evaluar se sumergen durante 5 minutos en el bioproducto reconstituido y ajustado a la concentración a evaluar siguiendo las especificaciones de la casa comercial. Los frutos tratados con el bioproducto se incuban durante 72 horas a 25 °C ± 1 °C y a una humedad de 90 % ± 5 % en un cuarto climatizado o cuarto designado para la elaboración del bioensayo. Posteriormente, cada una de las heridas se inocula con 20 µl de una suspensión de 1 x 10<sup>5</sup> conidios/ml del patógeno a evaluar, que en este caso corresponde a *P. digitatum*.

Los frutos inoculados se almacenan durante 6 días bajo condiciones controladas, ya sea en el cuarto climático o el cuarto de bioensayos. Finalizado el periodo de incubación se evalúa la presencia de signos o síntomas característicos del patógeno evaluado y se determina el porcentaje de inhibición empleando la ecuación 3.8:

$$\text{Inhibición(\%)} = \left( \frac{\bar{X}_{HIC} - \bar{X}_{HIT}}{\bar{X}_{HIC}} \right) \times 100$$

**Ecuación 3.8.** Inhibición (%).

Donde:

$\bar{X}$  HIC: Promedio del número de heridas infectadas en los frutos tratados con el patógeno solo.

$\bar{X}$  HIT: Promedio del número de heridas infectadas en los frutos tratados con el bioproducto.

El diseño experimental es completamente al azar. La unidad experimental consta de un fruto con 10 réplicas (10 frutos) y 3 repeticiones en el tiempo. Los tratamientos para evaluar deben incluir: primero, frutos inoculados con el bioproducto y el patógeno; segundo, frutos inoculados con el patógeno únicamente; tercero, frutos inoculados solo con agua destilada (testigo) y cuarto, frutos tratados solo con el bioproducto. Si se cuenta con la cepa de referencia se debe incluir en el diseño experimental.

## Metodología XII

**Patógeno modelo:** *Botrytis cinerea*

**Biocontrolador:** *Trichoderma harzianum*

**Patosistema:** *Frutos de manzana*

Batta (2004) describe una metodología para evaluar la eficacia de un producto a base de *T. harzianum* sobre *B. cinerea* mediante frutos de manzana Golden. Con esta metodología, se puede evaluar el efecto preventivo o curativo del bioproducto variando los tiempos de inoculación del microorganismo patógeno.

Para emplear este patosistema, al igual que los anteriores, se seleccionan frutos sanos de tamaño y madurez similar (preferiblemente manzanas maduras). A cada manzana desinfectada se le realizan dos heridas de 2 mm de diámetro y 2 mm de profundidad a cada lado con una herramienta cortopunzante estéril. Las heridas se inoculan con 25  $\mu$ l de los tratamientos a evaluar, que en este caso corresponderían a: 25  $\mu$ l del bioinsumo reconstituido y ajustado a la concentración indicada según las indicaciones de la etiqueta, 25  $\mu$ l de agua destilada estéril (tratamiento control absoluto), 25  $\mu$ l del patógeno *B. cinerea* a partir de una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios/ml y 25  $\mu$ l del biocontrolador (si se cuenta con la cepa de referencia del principio activo). Se debe tener en cuenta que en la aplicación del biocontrolador y del patógeno se ajustan las concentraciones de  $1 \times 10^7$  conidios/ml y  $1 \times 10^6$  conidios/ml respectivamente, pero al inocular las heridas con 25  $\mu$ l la concentración baja

2 exponentes, lo cual resulta en un valor de  $1 \times 10^5$  conidios/ml de *T. harzianum* y  $1 \times 10^4$  conidios/ml de *B. cinerea*.

Para la evaluación del efecto curativo, la inoculación del patógeno y del bioproducto se realiza al mismo tiempo, mientras que para la evaluación del efecto preventivo, la inoculación del bioproducto se realiza 36 horas antes de la inoculación del patógeno. Las manzanas inoculadas son introducidas dentro de cámaras húmedas tapadas y se ubican en un cuarto de incubación durante 32 días a  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  o se organizan dentro de un cuarto de ensayos con temperatura y humedad controlada ( $>80\%$ ) (figura 3.8). Cada 8 días se toma la medida del diámetro de la lesión característica causada por el patógeno, formada alrededor del sitio de inoculación, y 10 días después de la inoculación se observa la producción de esporas sobre la superficie de la fruta.



Foto: Liz Alejandra Uribe Gutiérrez

**Figura 3.8.** Cámara húmeda de bioensayo. Patosistema: Manzanas inoculadas con *B. cinerea*. Los frutos no están en contacto con la servilleta humedecida con agua estéril.

La eficacia del bioproducto se evalúa determinando el diámetro de la colonia a través del tiempo y el número de conidióforos por lesión, los cuales pueden ser observados empleando un microscópico óptico con un objetivo 40×.

**Tabla 3.3.** Determinación cualitativa de patogenicidad con base en el número de conidióforos por lesión

| Densidad<br>Conidióforos / lesión | Determinación<br>cualitativa    |     |
|-----------------------------------|---------------------------------|-----|
| > 200                             | Alta                            | +++ |
| > 50-99                           | Media                           | ++  |
| < 49                              | Baja                            | +   |
| 0                                 | No esporulación<br>(Inhibición) | -   |

Fuente: Elaboración propia

El diseño experimental es completamente al azar. La unidad experimental del experimento se organiza de la siguiente manera: una manzana con dos heridas. Es decir, el ensayo cuenta con 8 réplicas correspondientes a 8 heridas (4 manzanas) y debe repetirse 3 veces en el tiempo.

**Metodología XIII**

**Patógeno modelo:** *Botrytis cinerea*

**Biocontrolador:** *Trichoderma harzianum*

**Patosistema:** *Frutos de manzana*

Para evaluar la eficacia de un bioproducto a base de *Trichoderma* spp., Batta (2004) reporta una metodología que permite simular las condiciones naturales de la infección. Para esto emplea el patosistema de frutos de manzana con micro-heridas hechas con ayuda de una aguja estéril (puede ser de jeringa). En esta metodología se seleccionan manzanas de tamaño y madurez similar (manzanas maduras). A cada una de las frutas se les realizan 8 pinchazos distribuidos sobre toda la superficie con ayuda de una aguja estéril. Las frutas heridas son sumergidas durante 30 segundos en los diferentes tratamientos a evaluar correspondientes a: el bioinsumo reconstituido y ajustado a la concentración indicada según las indicaciones de la etiqueta, agua destilada estéril (tratamiento control absoluto) y suspensión del biocontrolador (si se cuenta con la cepa de referencia del principio activo ajustado a  $1 \times 10^7$  células/ml). Las frutas inoculadas se dejan secar durante 4 horas y, posteriormente, se realiza la inoculación del patógeno *B. cinerea* mediante aspersión sobre la superficie del fruto

de 1,5 ml de una suspensión de  $1 \times 10^6$  conidios/ml (aproximadamente 3 aspersiones para un volumen final de 1,5 ml).

Las manzanas inoculadas son introducidas dentro de cámaras húmedas tapadas y se ubican en un cuarto de incubación durante 32 días a  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  o se organizan dentro de un cuarto de ensayos con temperatura y humedad controlada ( $>80\%$ ). Cada 8 días se toma la medida del diámetro de la lesión característica causada por el patógeno, formada alrededor del sitio de inoculación, y 16 días después de la inoculación se observa la producción de esporas sobre la superficie de la fruta.

La eficacia del bioproducto se evalúa determinando el diámetro de la colonia a través del tiempo y el número de conidióforos por lesión, los cuales pueden ser observados empleando un microscópico óptico con un objetivo  $40\times$ .

El diseño experimental es completamente al azar. La unidad experimental del experimento se organiza de la siguiente manera: una manzana con 8 heridas o pinchazos. Es decir, el ensayo cuenta con 32 réplicas correspondientes a 8 heridas (4 manzanas) y debe repetirse 2 veces en el tiempo.

## Caso de estudio

El siguiente caso de estudio corresponde a un ensayo realizado por AGROSAVIA (2019b). En este se estandarizó una metodología para determinar la actividad biocontroladora de un bioinsumo a base de bacilos esporulados mediante la técnica de antagonismo. Los parámetros seleccionados para establecer la validez de la metodología propuesta son el de repetibilidad y reproducibilidad. Se analizaron 5 muestras.

Para esto y de manera independiente, se preparó una suspensión del bioplaguicida a la concentración de  $1 \times 10^8$  células/ml en una solución de agua suplementada con Tween 80 al 0,1 %. Cada muestra se homogeneizó con un vórtex durante un minuto y, posteriormente, se sembraron por triplicado 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión en una caja de Petri con medio PDA. Posteriormente, un fragmento de 0,7 cm de diámetro de *Fusarium* sp. previamente crecido en PDA se ubicó en el centro de cada caja inoculada con el agente biocontrolador teniendo en cuenta que el lado que evidenciara el crecimiento quedara en contacto con el medio de cultivo. Como testigo, se utilizaron cajas de Petri con PDA sin inoculación del agente biocontrolador, a las cuales se les sembró un fragmento de 0,7 cm de diámetro con el hongo.

El tratamiento y el testigo se incubaron a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 6 días debido a la rapidez de crecimiento del hongo fitopatógeno. Transcurrido este tiempo se midió el diámetro vertical y horizontal de cada colonia. Posteriormente, se promedió el diámetro de crecimiento y se calculó el porcentaje de inhibición utilizando la ecuación 3.9:

$$\text{Inhibición}(\%) = \left( \frac{A - B}{B} \right) \times 100$$

Ecuación 3.9. Inhibición (%).

Donde: A corresponde al diámetro de crecimiento del tratamiento control y B al diámetro de crecimiento del hongo en interacción con el agente biocontrolador.

Resultados del caso estudio

A continuación, se describirán los resultados obtenidos empleando la técnica propuesta con dos analistas.

Analista 1

Tabla 3.4. Datos brutos del diámetro de colonia (mm) obtenidos con el analista 1

| Tratamientos réplica |   | Diámetro vertical (mm) | Diámetro horizontal (mm) | Promedio (mm) |
|----------------------|---|------------------------|--------------------------|---------------|
| Muestra 1            | 1 | 15,29                  | 13,97                    | 7,63          |
|                      | 2 | 13,72                  | 12,86                    | 6,29          |
|                      | 3 | 12,18                  | 12,56                    | 5,37          |
| Testigo 1            | 1 | 67,81                  | 73,04                    | 63,43         |
|                      | 2 | 56,27                  | 60,78                    | 51,53         |
|                      | 3 | 57,97                  | 53,18                    | 48,58         |
| Muestra 2            | 1 | 13,17                  | 12,52                    | 5,85          |
|                      | 2 | 14,96                  | 15,49                    | 8,23          |
|                      | 3 | 12,89                  | 13,48                    | 6,19          |
| Testigo 2            | 1 | 60,98                  | 60,26                    | 53,62         |
|                      | 2 | 62,66                  | 61,28                    | 54,97         |
|                      | 3 | 51,87                  | 53,95                    | 45,91         |
| Muestra 3            | 1 | 13,45                  | 13,56                    | 6,51          |
|                      | 2 | 12,92                  | 12,73                    | 5,83          |
|                      | 3 | 12,91                  | 12,89                    | 5,9           |

(Continuación tabla 3.4)

| Tratamientos réplica |   | Diámetro vertical (mm) | Diámetro horizontal (mm) | Promedio (mm) |
|----------------------|---|------------------------|--------------------------|---------------|
| Testigo 3            | 1 | 54,91                  | 59,17                    | 50,04         |
|                      | 2 | 57,56                  | 56,48                    | 50,02         |
|                      | 3 | 63,65                  | 60,43                    | 55,04         |
| Muestra 4            | 1 | 11,37                  | 11,56                    | 4,47          |
|                      | 2 | 12,03                  | 12,02                    | 5,03          |
|                      | 3 | 11,86                  | 11,91                    | 4,89          |
| Testigo 4            | 1 | 60,76                  | 59,42                    | 53,09         |
|                      | 2 | 60,85                  | 61,84                    | 54,35         |
|                      | 3 | 51,57                  | 48,19                    | 42,88         |
| Muestra 5            | 1 | 11,5                   | 12,6                     | 5,05          |
|                      | 2 | 15,93                  | 16,69                    | 9,31          |
|                      | 3 | 13,54                  | 12,92                    | 6,23          |
| Testigo 5            | 1 | 64,27                  | 62,02                    | 56,15         |
|                      | 2 | 60,67                  | 60,84                    | 53,76         |
|                      | 3 | 60,33                  | 62,89                    | 54,61         |

Fuente: Elaboración propia

Tabla 3.5. Determinación del porcentaje de inhibición obtenido con el analista 1

| Muestra   | Réplica | Inhibición |
|-----------|---------|------------|
| Muestra 1 | 1       | 87,97      |
|           | 2       | 87,79      |
|           | 3       | 88,94      |
| Muestra 2 | 1       | 89,09      |
|           | 2       | 85,03      |
|           | 3       | 86,52      |
| Muestra 3 | 1       | 87,00      |
|           | 2       | 88,35      |
|           | 3       | 89,28      |
| Muestra 4 | 1       | 90,48      |
|           | 2       | 90,75      |
|           | 3       | 88,60      |
| Muestra 5 | 1       | 91,00      |
|           | 2       | 82,68      |
|           | 3       | 88,59      |

(Continúa)

(Continuación tabla 3.5)

| Muestra | Réplica                 | Inhibición |
|---------|-------------------------|------------|
|         | Promedio                | 88,14      |
|         | Desviación estándar     | 2,19       |
|         | Coficiente de variación | 2,49       |

Fuente: Elaboración propia

Analista 2

Tabla 3.6. Datos brutos del diámetro de colonia (mm) obtenidos con el analista 2

| Tratamientos réplica |   | Diámetro vertical (mm) | Diámetro horizontal (mm) | Promedio (mm) |
|----------------------|---|------------------------|--------------------------|---------------|
| Muestra 1            | 1 | 11,95                  | 8,31                     | 3,13          |
|                      | 2 | 9,1                    | 8,61                     | 1,86          |
|                      | 3 | 11,02                  | 7,96                     | 2,49          |
| Testigo 1            | 1 | 53,11                  | 58,77                    | 48,94         |
|                      | 2 | 61,94                  | 63,77                    | 55,86         |
|                      | 3 | 44,55                  | 32,97                    | 31,76         |
| Muestra 2            | 1 | 10,72                  | 11,73                    | 4,23          |
|                      | 2 | 11,37                  | 10,71                    | 4,04          |
|                      | 3 | 11,9                   | 12,02                    | 4,96          |
| Testigo 2            | 1 | 61,28                  | 61,27                    | 54,28         |
|                      | 2 | 63,82                  | 61,97                    | 55,90         |
|                      | 3 | 57,3                   | 53,17                    | 48,24         |
| Muestra 3            | 1 | 11,41                  | 12,28                    | 4,85          |
|                      | 2 | 10,22                  | 10,84                    | 3,53          |
|                      | 3 | 15,27                  | 14,12                    | 7,70          |
| Testigo 3            | 1 | 64,32                  | 64,11                    | 57,22         |
|                      | 2 | 64,11                  | 65,1                     | 57,61         |
|                      | 3 | 46,81                  | 46,83                    | 39,82         |
| Muestra 4            | 1 | 12,29                  | 10,85                    | 4,57          |
|                      | 2 | 12,43                  | 12,09                    | 5,26          |
|                      | 3 | 13,53                  | 13,91                    | 6,72          |
| Testigo 4            | 1 | 69,21                  | 63,24                    | 59,23         |
|                      | 2 | 63,27                  | 65,98                    | 57,63         |
|                      | 3 | 64,21                  | 65,32                    | 57,77         |

(Continúa)

(Continuación tabla 3.6)

| Tratamientos réplica |   | Diámetro vertical (mm) | Diámetro horizontal (mm) | Promedio (mm) |
|----------------------|---|------------------------|--------------------------|---------------|
| Muestra 5            | 1 | 11,48                  | 11,19                    | 4,34          |
|                      | 2 | 14,39                  | 13,62                    | 7,01          |
|                      | 3 | 12,56                  | 12,1                     | 5,33          |
| Testigo 5            | 1 | 61,74                  | 71,65                    | 59,70         |
|                      | 2 | 61,66                  | 71,28                    | 59,47         |
|                      | 3 | 64,23                  | 68,28                    | 59,26         |

Fuente: Elaboración propia

Tabla 3.7. Determinación del porcentaje de inhibición obtenido con el analista 2

| Muestra   | Réplica                 | Inhibición |
|-----------|-------------------------|------------|
| Muestra 1 | 1                       | 93,6       |
|           | 2                       | 96,67      |
|           | 3                       | 92,15      |
| Muestra 2 | 1                       | 92,77      |
|           | 2                       | 92,77      |
|           | 3                       | 89,71      |
| Muestra 3 | 1                       | 91,53      |
|           | 2                       | 93,87      |
|           | 3                       | 80,67      |
| Muestra 4 | 1                       | 92,06      |
|           | 2                       | 90,87      |
|           | 3                       | 88,36      |
| Muestra 5 | 1                       | 92,73      |
|           | 2                       | 88,22      |
|           | 3                       | 91         |
|           | Promedio                | 91,13      |
|           | Desviación estándar     | 3,61       |
|           | Coficiente de variación | 3,96       |

Fuente: Elaboración propia



Fotos: Lisette Torres Torres

Figura 3.9. Inhibición producida por *B. amyloqueliciens* sobre *Fusarium* sp.

Análisis

Los resultados mostraron que en los datos obtenidos con el analista 1 hubo una variabilidad de 2,49 %, mientras que en los datos obtenidos con el analista 2 se registró una variabilidad de 3,96 %, lo que indica que la técnica presenta una alta repetibilidad.

Con respecto a la reproducibilidad, se obtuvo un coeficiente de variación global de 2,11 %, resultado que demuestra la reproducibilidad de la técnica entre los dos analistas y con diferente tiempo de análisis (tabla 3.8).

Tabla 3.8. Determinación del coeficiente de reproducibilidad

| Analistas                        | Promedio Inhibición (%) | Desviación (S / $\sigma$ ) |
|----------------------------------|-------------------------|----------------------------|
| 1                                | 88,14                   | 2,19                       |
| 2                                | 91,13                   | 3,61                       |
| Desviación Sr (repetibilidad)    |                         | 2,9                        |
| Desviación SR (reproducibilidad) | 2,11                    |                            |

Fuente: Elaboración propia

**Límite de aceptación:** como límite de aceptación se establece para el bioplaguicida a base de *Bacillus amyloqueliciens* un porcentaje de inhibición mayor al 80 %.

En conclusión, las diferentes repeticiones de la técnica presentaron valores similares con coeficientes de variación inferiores al 10 % (límite máximo de aceptación) con

todas las muestras. Por tal razón, se puede concluir que la metodología analítica para determinar la actividad biocontroladora de bioinsumos a base de bacilos esporulados mediante el método de antagonismo es repetible y reproducible en el tiempo.

## Perspectivas

- Los criterios biológicos y las consideraciones descritas en este capítulo constituyen una herramienta para la definición, la estandarización y el registro de procedimientos que pueden ser incorporados en la evaluación rutinaria de la eficacia de bioinsumos de uso agrícola para el control de fitopatógenos.
- La selección de las metodologías recopiladas en este capítulo pretende ser una línea base para la normalización de procedimientos que garanticen la correcta evaluación de los bioinsumos que se comercializan en Colombia y el mundo.
- Los resultados obtenidos en cuanto a la eficacia de bioinsumos de uso agrícola para el control de fitopatógenos con las metodologías descritas están alineados con las consideraciones dadas sobre la obtención de resultados confiables y la trazabilidad de estos.

## Referencias

- Abd-Elgawad, M. M. (2020). Optimizing biological control agents for controlling nematodes of tomato in Egypt. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(58), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00252-x>
- Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo [Aecid] & Escuela de Agricultura de la Región Tropical Húmeda [Earth]. (s. f.). *Manejo de plagas y enfermedades*. <http://usi.earth.ac.cr/glas/sp/DocTecnicos/Promes/Pina7.pdf>
- Aguirre, L., Calderón, M., Bautista, P., & Ragazzo, J. (2018). Application of powder formulation of *Meyerozyma caribbica* for postharvest control of *Colletotrichum gloeosporioides* in mango (*Mangifera indica* L.). *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 113(1), 108-271. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108271>
- Alarcón, J., & Jiménez, Y. (2012). *Manejo fitosanitario del cultivo del plátano (Musa spp.) Medidas para la temporada invernal*. ICA.

- Amaya, C., Biotina, B., Jiménez, S., Uribe, L., Tibasosa, G., Jiménez, H., Nisbet, H., Hume, M., & Rodríguez, F. (2019). *Actividad antimicrobiana de bacteria del Banco de Germoplasma de Microorganismos de AGROSAVIA*. [Póster]. V Bogotá Microbial Meeting BoMM, Bogotá, Colombia.
- Arévalo, E., Díaz, A., Galindo, J., & Rivero, M. (2011). *Manejo fitosanitario del cultivo de mora (Rubus glaucus Benth) Medidas para la temporada invernal*. ICA.
- Asociación Hortifrutícola de Colombia [Asohofructol] & Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria [Corpoica]. (2013). Modelo tecnológico para el cultivo del mango en el Valle del alto Magdalena en el Departamento del Tolima.
- Batta, Y. (2004). Postharvest biological control of apple gray mold by *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in an invert emulsion. *Crop Protection*, 23(1), 19-26. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(03\)00163-7](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(03)00163-7)
- Cámara de Comercio de Bogotá [CCB]. (2015a). *Manual de tomate de árbol* [Manual]. <https://www.ccb.org.co/content/download/13726/175108/version/1/file/Tomate+de+%C3%A1rbol.pdf>
- Cámara de Comercio de Bogotá [CCB]. (2015b). *Manual Lulo* [Manual]. <http://hdl.handle.net/11520/14317>
- Cano, M. (2013). Estrategias biológicas para el manejo de enfermedades en el cultivo de fresa (*Fragaria* spp.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 7(2), 263-276.
- Caplice, E., & Fitzgerald, G. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International journal of food microbiology*, 50(1-2), 131-149.
- Carbó, A., Torres, R., Usall, J., Fons, E. & Teixidó, N. (2017). Dry formulations of the biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 using fluidised bed drying to control the main postharvest diseases on fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(11), 3691-3698. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8229>
- Castaño, J., & Leal, J. (2018). Manejo integrado de la pudrición de raíces del aguacate (*Persea americana* Miller), causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Temas Agrarios*, 23(2), 131-143. <https://doi.org/10.21897/rta.v23i2.1297>
- Castellano, G., Quijada, O., Guanipa, N., Camacho, R., & Fonseca, Y. (2003). Control de la pudrición apical del fruto y secamiento del árbol mediante manejo integral del cultivo del guayabo (*Psidium guajava* L.). *Bioagro*, 15(2), 135-142.

- Convención Internacional de Protección Fitosanitaria [CIPF]. (2016). *Glosario de términos fitosanitarios*. [https://www.ippc.int/static/media/files/publication/es/2017/06/ISPM\\_05\\_2016\\_Es\\_2017-04-24\\_PostCPM12\\_InkAmLRG.pdf](https://www.ippc.int/static/media/files/publication/es/2017/06/ISPM_05_2016_Es_2017-04-24_PostCPM12_InkAmLRG.pdf)
- Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria [AGROSAVIA]. (2019a). *Evaluación del antagonismo de agentes microbiales a base de Trichoderma konin-giopsis, Trichoderma harzianum y Trichoderma asperellum contra Sclerotinia sclerotiorum en condiciones “in vitro” - Código GA-R-157*. AGROSAVIA.
- Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria [AGROSAVIA]. (2019b). *Vinculación de Conocimiento y Tecnología. Determinación de la actividad biocontroladora de bioinsumos a base de bacilos esporulados (método de antagonismo). Formato de Informe de Estandarización - Código VC-F-178*.
- Cotes, A. (2018). El concepto de control biológico y sus premisas fundamentales. En A. Cotes. (Ed.), *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: agentes de control biológico* (pp. 1-16). AGROSAVIA.
- De Almeida, B., Da Silva, W., Schurt, D., Ishida, A., De Souza, G., & De Lima, K. (2015). Understanding the mechanism of biological control of passionfruit bacterial blight promoted by autochthonous phylloplane bacteria. *Biological Control* 80(1), 40-49. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.09.011>
- Dean, R., Van Kan, J., Pretorius, Z., Hammond, K., Di Pietro, A., Spanu, P., Rudd, J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(4), 414-430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- De Corato, U., Salimbeni, R., De Pretis, A., Avella, N., & Patruno, G. (2018). Use of alginate for extending shelf life in a lyophilized yeast-based formulate in controlling green mould disease on citrus fruit under postharvest condition. *Food Packaging and Shelf Life*, 15(1), 76-86. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.11.006>
- EcuRed. (s. f.). *Enfermedades del cultivo de la papaya*. [https://www.ecured.cu/Enfermedades\\_del\\_cultivo\\_de\\_la\\_papaya](https://www.ecured.cu/Enfermedades_del_cultivo_de_la_papaya).
- Ellis, S., & Boehm, M. (2008). *Plants get sick too! An introduction to plant diseases. Agriculture and natural resources*. The Ohio State University.
- Ellis, S., Boehm, M., & Mitchell, T. (2008). *Fungal and fungal-like diseases of plants. Fact Sheet (PP401. 07) Agriculture and natural resources*. The Ohio State University.

- Falkowski, P., Fenchel, T., & Delong, E. (2008). The microbial engines that drive earth's biogeochemical cycles. *Science*, 320(5879), 1034-1039. <https://doi.org/10.1126/science.1153213>
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of biotechnology*, 285(1), 44-55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>
- French, E. R. (1982). *Métodos de investigación fitopatológica*. ICA.
- Freudig, B., Hogekamp, S., & Schubert, H. (1999). Dispersion of powders in liquids in a stirred vessel. *Chemical engineering and processing*, 38(1), 525-532. [https://doi.org/10.1016/S0255-2701\(99\)00049-5](https://doi.org/10.1016/S0255-2701(99)00049-5)
- Ge, X., Wei, W., Li, G., Sun, M., Li, H., Wu, J. & Hu, F. (2017). Isolated *Pseudomonas aeruginosa* strain VIH2 and antagonistic properties against *Ralstonia solanacearum*. *Microbial pathogenesis*, 111(1), 519-526. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.020>
- Gil, J., Sánchez, D., & Osorio, J. (2015). Estudios etiológicos da murcha-do-abacateiro em Antioquia, Colômbia. *Ceres*, 61(1), 50-61. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2014000100007>
- Glare, T., & Moran, M. (2016). *Microbial-based Biopesticides: Methods and Protocols*. Humana Press.
- Harekrushna, S., & Kumar, D. (2012). A review on bioremediation. *International Journal of Research in Chemistry and Environment*, 2(1), 13-21.
- Instituto Colombiano Agropecuario [ICA]. (2019). *Productos bioinsumos registrados*. <https://www.ica.gov.co/getdoc/2ad9e987-8f69-4358-b8a9-e6ee6dcc8132/productos-bioinsumos-mayo-13-de-2008.aspx>
- Junior, W., Binati, R., Felis, G., Slaghenau, D., Ugliano, M., & Torriani, S. (2020). Volatile organic compounds from *Starmerella bacillaris* to control gray mold on apples and modulate cider aroma profile. *Food Microbiology*, 89(1), 103446. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103446>
- Kamoun, S., Furzer, O., Jones, J., Judelson, H., Ali, G., Dalio, R. J., Guha, S., Schena, L., Zambounis, A., Panabières, F., Cahill, D., Ruocco, M., Figueiredo, A., Chen, X., Hulvey, J., Stam, R., Lamour, K., Gijzen, M., Tyler, B., Grünwald, N, Shahid, M., Tomé, D., Tör, M., Van Den Ackerveken, G., McDowell, J., Daayf, F., E Fry, W., Lindqvist-Kreuz, H., J. G. Meijer, H., Petre, B., Ristaino, J., Yoshida, K., R J Birch, P., & Govers, F. (2015). The Top 10 oomycete patho-

- gens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 16(4), 413-434. <https://doi.org/10.1111/mpp.12190>
- Leiva, L. (2018). *Manejo fitosanitario del cultivo de la guayaba (Psidium guajava, L.): medidas para la temporada invernal*. ICA.
- Lemessa, F., & Zeller, W. (2007). Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. *Biological control*, 42(3), 336-344. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.05.014>
- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., & Liu, Y. (2013). Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2), 153-160. <https://10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.004>
- Locey, K., & Lennon, J. (2016). Scaling laws predict global microbial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(21), 5970-5975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521291113>
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., & Toth, I. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(6), 614-629. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>
- Montes, S. (2019). Los cultivos que fueron más rentables en 2019 y a los que se apostará en 2020. <https://www.agronegocios.co/agricultura/los-cultivos-que-fueron-mas-rentables-en-2019-y-a-los-que-se-apostara-en-2020-2945365>
- Morgan, C., Herman, N., White, P., & Vesey, G. (2006). Preservation of micro-organisms by drying, a review. *Journal of Microbiological Methods*, 66(2), 183-193. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>
- Muller, J. A., Stanton, C., Sybesma, W., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. (2010). Reconstitution conditions for dried probiotic powders represent a critical step in determining cell viability. *Journal of Applied Microbiology*, 108(4), 1369-1379. [doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04533.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04533.x)
- Parada, M., & Muñoz, C. (2015). *Bioinsumo de uso agrícola: Potencialidades y Desafío*. <https://agriculturers.com/bioinsumos-de-uso-agricola-potencialidades-y-desafios/>
- Pérez, J. (2018). Screening of a biological control bacterium to fight avocado diseases: from agroecosystem to bioreactor. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14(1), 109-115. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.02.005>

- Ren, X., Kong, Q., Wang, H., Yu, T., Zhou, W., & Zheng, X. (2012). Biocontrol of fungal decay of citrus fruit by *Pichia pastoris* recombinant strains expressing cecropin A. *Food Chemistry*, 131(3), 796-801. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.046>
- Ríos, L., Puentes, Carol., Carabalí, A., Gómez, Y., Becerra, C., & Chávez, L. F. (2019). *Prácticas de manejo sostenible para el cultivo de piña*. AGROSAVIA.
- Rokem, J., Lantz, A., & Nielsen, J. (2007). Systems biology of antibiotic production by microorganisms. *Natural product reports*, 24(6), 1262-1287. <https://doi.org/10.1039/b617765b>
- Ryan, A., Kinkel, L., & Schottel, J. (2004). Effect of pathogen isolate, potato cultivar, and antagonist strain on potato scab severity and biological control. *Biocontrol Science and Technology*, 14(3), 301-311. <https://doi.org/10.1080/09583150410001665187>
- Seem, R. (1984). Disease incidence and severity relationships. *Annual Review of Phytopathology*, 22(1), 133-150. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.22.090184.001025>
- Tamayo, P. (2001). *Enfermedades del cultivo del lulo en Colombia: guía de diagnóstico y control*. AGROSAVIA.
- Tan, S., Jiang, Y., Song, S., Huang, J., Ling, N., XU, Y., & Shen, Q. (2013). Two *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated using the competitive tomato root enrichment method and their effects on suppressing *Ralstonia solanacearum* and promoting tomato plant growth. *Crop Protection*, 43(1), 134-140. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.08.003>
- Trivedi, P., Pandey, A., & Palni, L. M. S. (2008). *In vitro* evaluation of antagonistic properties of *Pseudomonas corrugata*. *Microbiological Research*, 163(3), 329-336. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.06.007>
- Ventura, R., Bautista, S., Flores, G., & Zavaleta, L. (2018). Impact of chitosan based edible coatings functionalized with natural compounds on *Colletotrichum fragariae* development and the quality of strawberries. *Food chemistry*, 262(1), 142-149. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.063>
- Viterbo, A., Ramot, O., Chernin, L., & Chet, I. (2002). Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1-4), 549-556. <https://doi.org/10.1023/A:1020553421740>

- Wang, S., Ruan, C., Yi, L., Deng, L., Yao, S., & Zeng, K. (2020). Biocontrol ability and action mechanism of *Metschnikowia citriensis* against *Geotrichum citri-aurantii* causing sour rot of postharvest citrus fruit. *Food Microbiology*, 87(1), 103375. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103375>
- Wijesinghe, C. J., Wijeratnam, R. W., Samarasekara, J., & Wijesundera, R. (2011). Development of a formulation of *Trichoderma asperellum* to control black rot disease on pineapple caused by (*Thielaviopsis paradoxa*). *Crop Protection*, 30(3), 300-306. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.11.020>
- Zhang, J., Xie, J., Zhou, Y., Deng, L., Yao, S., & Zeng, K. (2017). Inhibitory effect of *Pichia membranaefaciens* and *Kloeckera apiculata* against *Monilinia fructicola* and their biocontrol ability of brown rot in postharvest plum. *Biological Control*, 114(1), 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.07.013>

