

HACIA UN CONCEPTO de biotecnología agrícola

AUTORES: DRA. ERIKA NAVA-REYNA,

Investigador del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias CENID-RASPA.

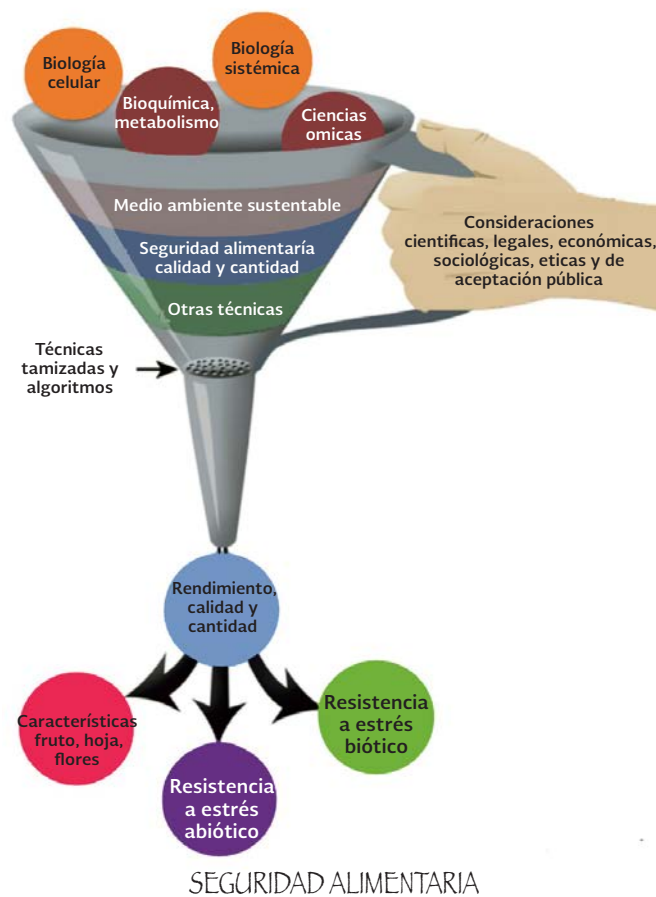
De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en el año 2050 la población mundial habrá crecido un 34 por ciento respecto al 2007, alcanzando los 9.1 billones de personas, de los cuales, cerca de 8 billones vivirán en países en desarrollo. Para lograr la seguridad alimentaria de dicha población se requerirá un incremento en la producción global de alimentos de un 70 por ciento para ese año, lo que representa alrededor de 1 billón de toneladas de cereales y 200 millones de toneladas de carne. Además, el cambio climático, la pérdida de biodiversidad y las fuentes de energía fósiles limitadas que demandan fuentes alternativas como la biomasa vegetal para producción de bioenergéticos, han también aumentado en gran medida la demanda agrícola para satisfacer las necesidades humanas. Más aún, se estima que la demanda total futura de productos agrícolas puede incluso exceder a la demanda alimentaria, principalmente por la conversión de biomasa vegetal en biocombustibles [1]. Todo esto ha generado un gran interés en mejorar, cada vez más, la eficiencia de la producción agrícola mediante ciertos mecanismos como diversas prácticas de manejo y mejoras genéticas de los cultivos, así como en controlar plagas y enfermedades y favorecer el crecimiento de las plantas, para lo cual se han empleado indiscriminadamente una amplia variedad de agroquímicos que han generado resistencia en los patógenos y plagas, al igual que un grave daño ecológico y ambiental e incluso, intoxicaciones y enfermedades en poblaciones humanas. Por lo anterior, la biotecnología se ha convertido en la herramienta más importante del siglo XXI para lograr la seguridad alimentaria mundial de una forma amigable con el medio ambiente.

Biología se refiere a la aplicación tecnológica que utiliza entidades biológicas, organismos vivos o sus derivados biológicos, para producir un bien o servicio. En la agricultura, la biotecnología se ha empleado para mejorar los cultivos a través de una gran diversidad de herramientas y elementos que incluyen bioinformática, microbiología, biología molecular, genética, bioquímica, fisiología vegetal, fitotecnia, cultivo de tejidos y micropropagación, entre otras.

De esta manera, la biotecnología agrícola ofrece una nueva plataforma para las innovaciones científicas, ofreciendo medios eficientes y rentable para la producción de una diversidad de bienes y servicios novedosos y de valor agregado. Actualmente, está enfocada en la mejora continua de los rasgos agronómicos de los cultivos, como la resistencia al estrés biótico y abiótico y mejorar la calidad nutricional y la funcionalidad de los productos agrícolas, además de otras cuestiones como el empleo de cultivos como materia prima para la producción de biocombustibles, el

uso de plantas para fabricación de productos terapéuticos e industriales y la búsqueda del aprovechamiento de los residuos agrícolas (Figura 1). Algunas de los principales objetivos de la biotecnología agrícola se mencionan a continuación.

FIGURA 1. CRIBADO DE LOS PRINCIPALES OBJETIVOS DE LA BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA Y VEGETAL. EL EMBUDO SE NUTRE DE DIVERSAS HERRAMIENTAS DE LA BIOTECNOLOGÍA QUE DA COMO RESULTADO PRODUCTOS QUE CUMPLEN LOS OBJETIVOS DE LA BIOTECNOLOGÍA EN LA AGRICULTURA, TOMANDO EN CUENTA DIVERSAS CONSIDERACIONES ÉTICAS, ECONÓMICAS Y SOCIALES IMPORTANTES [2].



Biofertilizantes

Debido a los múltiples problemas ambientales y en la salud humana causados por el uso excesivo de fertilizantes químicos en la agricultura, generar nuevos fertilizantes biológicos compuestos por microorganismos benéficos para los cultivos se ha convertido en uno de los principa-

les objetivos de la biotecnología agrícola, ya que tienen un papel potencial para proveer seguridad alimentaria y generar una producción sustentable de los cultivos. Esta tendencia amigable con el medio ambiente ha favorecido una amplia gama de aplicaciones para las rizobacterias promotoras del crecimiento, los hongos endo y ectomicorrízicos, las cianobacterias, entre otros microorganismos, los cuales colonizan la rizósfera o el interior de las plantas para así favorecer la toma de nutrientes, el crecimiento y la tolerancia al estrés biótico y abiótico de las plantas. Los microorganismos fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fosfatos y los celulolíticos son aplicados a las semillas, el suelo o áreas de composteo para incrementar el número de microorganismos y acelerar los procesos metabólicos que permiten mayor disponibilidad de los nutrientes a las plantas.

Aunado a lo anterior, la aplicación de biofertilizantes es una de las prácticas de manejo que pueden ayudar a mantener o incrementar el contenido de materia orgánica e incrementar la fertilidad del suelo, sobre todo en suelos en que se emplea la labranza. Más aún, las nuevas tecnologías de ingeniería genética permiten incluso mejorar rutas biológicas de producción de fitohormonas, haciendo a los microorganismos aún más eficientes.

Es importante mencionar que los beneficios de aplicar esta tecnología, en cuanto a la detención y reparación del daño al suelo por los agroquímicos convencionales y la erosión, no puede observarse en un periodo corto de tiempo, a diferencia de los fertilizantes químicos. Sin embargo, los beneficios económicos, agronómicos y ambientales a largo plazo son mucho mayores.

El gran crecimiento del mercado de biofertilizantes en los últimos años está vinculado principalmente al aumento de la demanda por alimentos orgánicos a nivel mundial, al igual que la creciente conciencia ambiental sobre los efectos negativos de los agroquímicos y el mayor apoyo gubernamental a los fabricantes de fertilizantes biológicos. El mercado mundial de biofertilizantes fue de 946.6 millones de dólares en 2015 y se espera un crecimiento del 14.08% del 2016 al 2022, siendo las bacterias fijadoras de nitrógeno las de mayor demanda con más del 75%, seguidas por las bacterias solubilizadoras de fosfatos con 15%.

Biopesticidas

El desarrollo de resistencia de plagas y agentes etiológicos de enfermedades a los agroquímicos, aunado al incremento de la demanda por cultivos orgánicos, ha convertido en una prioridad de la agricultura moderna el desarrollo de métodos alternativos para el control de insectos y microorganismos. Así, diferentes metabolitos de plantas y microorganismos se han empleado como biopesticidas y biofungicidas. Enzimas microbianas como las endo y exoquitinasas han sido empleadas para el control de insectos que generan plagas agrícolas como el caracol manzana, la polilla de la cera, la rosquilla negra y el gusano cortador grasiento, así como de hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*. Su eficacia se debe a su habilidad para hidrolizar el quitosán de la pared celular fúngica y del exoesqueleto de los insectos.

Otras enzimas como las β -1,3-glucanasas y proteasas juegan también papeles importantes en la degradación de las paredes fúngicas. Por su parte, hidrolizados enzimáticos de plantas, por ejemplo, la mostaza amarilla y oriental, han sido empleados para obtener metabolitos presentes naturalmente en las plantas para producir compuestos pesticidas como el 2-propenil isotiocianato y el tiocianato. También se han aplicado bio-aceites de hojas y granos de tabaco pirolizados como un potente insecticida (contra el escarabajo de la patata) bactericida (contra la roña común de la papa y la podredumbre anular) y fungicida (contra la pudrición acuosa).

Microorganismos como *Trichoderma harzianum* han sido también muy utilizados para el biocontrol de distintas plagas y enfermedades agrícolas, debido a su habilidad para controlar diversos patógenos del suelo y las semillas, la producción de enzimas celulolíticas, proteolíticas, entre otras, la producción de metabolitos secundarios antimicrobianos, su tasa de crecimiento relativamente más rápida y su conformación fisiológica, a la vez que puede actuar como un efectivo biofertilizante al promover el crecimiento de las plantas por la síntesis de fitohormonas, la inducción de mecanismos de defensa en las plantas al asociarse con las raíces y la transferencia de minerales de la rizósfera.

El control de enfermedades virales en los cultivos se ha enfocado principalmente al control de los vectores, empleando así diversos insecticidas químicos y biotecnológicos. Sin embargo, durante los últimos años se ha comenzado a estudiar la eficacia de la aplicación de diversas técnicas de biología molecular e ingeniería genética para el control directo de los virus. Por ejemplo, recientemente se descubrió un nuevo mecanismo de resistencia que depende de una serina en el gen que codifica a hidroximetiltransferasa contra quistes de nematodos que afectan la soya, lo que abre nuevas perspectivas para el control de vectores de nematodos. Además, numerosos estudios han demostrado la resistencia de cultivos transgénicos contra virus de plantas a través de interferencia de RNA, lo que representa una opción sustentable e integrada para el control de virus. Otra estrategia es la síntesis de anticuerpos codificados en genes animales producidos en plantas genéticamente modificadas (GM) contra virus determinados, también llamados "planticuerpos", como algunos contra proteínas de la cubierta de virus como el de la arruga de motas de alcachofa.





Mejoramiento genético de las plantas.

El fitomejoramiento clásico, así como las técnicas modernas de biología molecular, incluyen un conjunto de instrumentos que emplean genes como materia prima. En ambas herramientas se busca la creación de nuevas variedades de plantas con objetivos particulares como un mayor rendimiento de producción, mayor resistencia a plagas o enfermedades, mejor calidad nutricional de granos o frutos y tolerancia a factores ambientales adversos (pH, temperatura, salinidad, etc.).

El fitomejoramiento clásico se basa en la selección artificial y cruzamientos selectivos de dos genotipos diferentes de la misma especie, cultivadas o silvestres, que posean las características deseadas con la variedad que se quiere mejorar. De esta manera, se obtienen semillas con diferentes combinaciones génicas con las que se podrán seleccionar las mejores en las siguientes generaciones. Esta técnica basa su éxito en la capacidad de producir semillas fértiles de las plantas que resultan de los cruzamientos. Las condiciones de cultivo son controladas y se realizan generalmente en invernaderos. La hibridación no sólo se puede dar entre diferentes variedades de una misma especie (también llamada hibridación intervarietal), sino que también puede ser entre especies (hibridación interespecífica) y géneros (hibridación intergenérica). La fresa (*Fragaria ananassa*) fue obtenida a partir de *Fragaria chiloensis*, un fruto grande pero insípido, que se cruzó con *Fragaria virginiana*, una fresa del Este de Norteamérica de gran sabor. Otro ejemplo de un cultivo obtenido por hibridación es el triticale (*X Triticosecale Wittmack*), obtenido del cruzamiento del trigo (*Triticum aestivum*) y el centeno (*Secale cereale*), el cual es utilizado como forraje en sistemas de producción de leche y carne en países de clima templado, y es resistente a diversas condiciones ambientales adversas como bajas temperaturas o sequía.

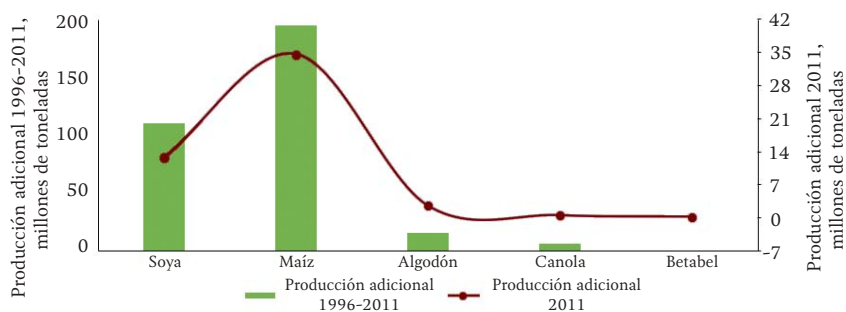
Otra técnica de mejoramiento es la mutagénesis inducida, la cual ha sido aplicada desde mediados del siglo XX. En esta técnica se emplean sustancias químicas o radiaciones para inducir mutaciones al azar en el genoma que generan cambios morfológicos en las plantas, seleccionando aquellas que desarrollen las características deseadas. Luego de más de tres décadas, la aplicación de la mutación inducida se ha convertido en una estrategia de fitomejoramiento bien establecida que ha permitido desarrollar más de 3,200 variedades de cultivo que son sembradas en más de 60 países a nivel mundial [3], siendo los cereales casi la mitad de los cultivos registrados en la Base de Datos de Variedades Mutantes (MVD). De éstos, el 53%

son variedades mutantes de arroz, seguido de trigo con un 20%.

La polinización y fertilización *in vitro* representa una alternativa para romper las barreras sexuales entre organismos de diferentes especies y géneros, cultivando los embriones *in vitro*. El cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos vegetales es una herramienta que acompaña a otras técnicas de mejoramiento vegetal y está basada en una propiedad de las plantas denominada totipotencialidad celular, es decir, que toda célula viva e íntegra de una planta es capaz de regenerar una planta completa igual a la original. Por ejemplo, mediante el cultivo de células o tejidos se pueden generar variaciones somaclonales, mutaciones al azar transitorias o permanentes que se dan durante el cultivo.

Gracias al empleo de técnicas de la biotecnología moderna se ha logrado acelerar el proceso de hibridación, presentando además otras ventajas respecto a las técnicas tradicionales, ya que pueden insertarse solamente genes de interés que pueden observarse en la primera generación. La ingeniería genética elimina también en gran medida el azar presente en el mejoramiento tradicional, volviéndola más segura y eficiente. Además, los genes que se van a incorporar pueden provenir de cualquier especie, sin importar su parentesco. Los principales cultivos transgénicos comerciales son soya, maíz, algodón y canola herbicidas y resistentes a insectos. Otros cultivos incluyen papas dulces resistentes a virus en África, árboles frutales que son productivos años antes, plantas que producen nuevos plásticos con propiedades únicas y una gran variedad de cultivos resistentes a condiciones climatológicas extremas. De esta manera, las técnicas para modificar genéticamente los alimentos representan una gran alternativa para responder a algunos de los mayores desafíos para el siglo XXI. En 1994 se plantaron los primeros cultivos comerciales GM y para 2011 la superficie global de siembra de cultivos GM fue de cerca de 148 millones de hectáreas. A pesar de la rápida adopción de cultivos GM en muchos países, la controversia sobre sus riesgos y beneficios está aún vigente. De acuerdo con diversos estudios, los cultivos GM son seguros para el consumo humano y el medio ambiente e incluso hay evidencia sobre sus beneficios, como mayores rendimientos y menores costos de producción [4]. A nivel global, esta tecnología generó un impacto positivo en las ganancias a los agricultores, representando 19.8 billones de dólares en 2011, lo que equivale a un 6.2% adicional del valor global de la producción de soya, maíz, canola y algodón (Gráfica 1).

Gráfica 1. PRODUCCIÓN ADICIONAL DE LOS CULTIVOS DERIVADA DE LOS EFECTOS POSITIVOS EN EL RENDIMIENTO DE LOS CULTIVOS GM.



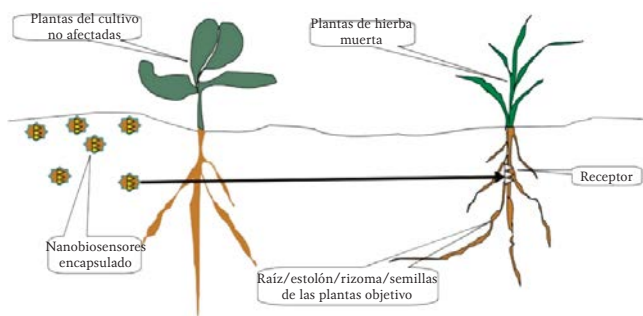
Nota: El betabel sólo se cultivó en Estados Unidos y Canadá a partir del 2008 [4].

Las plantas GM también han sido empleadas como biorreactores para la producción de biofarmacéuticos externos no vegetales, incluyendo algunos péptidos bioactivos, vacunas, anticuerpos y muchos otros productos terapéuticos como vitaminas, ácido hialurónico y colágeno [5]. De esta manera se han obtenido, por ejemplo, arroz con mayor contenido de hierro y vitaminas que combaten la malnutrición crónica en países asiáticos y plátanos que producen vacunas humanas contra enfermedades infecciosas como hepatitis B.

Nanobiotecnología

La nanotecnología es un campo promisorio en la investigación multidisciplinaria, incluida la agricultura. Esta nueva tecnología utiliza materiales y equipos capaces de manipular las propiedades físicas y químicas de una sustancia a nivel molecular. El uso de la nanotecnología en conjunto con la biotecnología tiene el potencial de revolucionar la agricultura y la industria alimentaria, dando nuevas herramientas para el manejo molecular de enfermedades mediante sistemas de liberación para el control de enfermedades y una rápida detección y erradicación de patógenos, específicamente virus, ya que la nanotecnología opera en la misma escala que éstos. Además, la nanobiotecnología puede aumentar el entendimiento de la biología de diversos cultivos que puede emplearse para incrementar rendimientos o valorar nutricional, así como para desarrollar sistemas mejorados para monitorear condiciones climatológicas, generar biopesticidas y bioherbicidas más eficientes (Figura 2), desarrollar nuevas técnicas de biología molecular y celular, incrementar la capacidad de las plantas de absorber nutrientes, entre otras. Por ejemplo, se han realizado investigaciones sobre la síntesis de nanobiofertilizantes para regular la liberación de nutrientes en función de las necesidades del cultivo, teniendo mayor eficiencia que los fertilizantes convencionales [6].

Figura 2. LIBERACIÓN INTELIGENTE DE BIOHERBICIDAS NANOENCAPSULADOS EN EL AMBIENTE CULTIVO-HIERBA [7].



Las nanopartículas se dirigen a los receptores específicos de las plantas de hierba

El diseño de nanobiosensores es otra de las aplicaciones de la nanobiotecnología que pueden favorecer a la agricultura. Los sensores son instrumentos que responden a aspectos fisicoquímicos y biológicos con una señal que puede ser detectada. El empleo de nanobiosensores enzimáticos permite obtener un equipo con mayor sensibilidad, permitiendo una respuesta más rápida a cambios

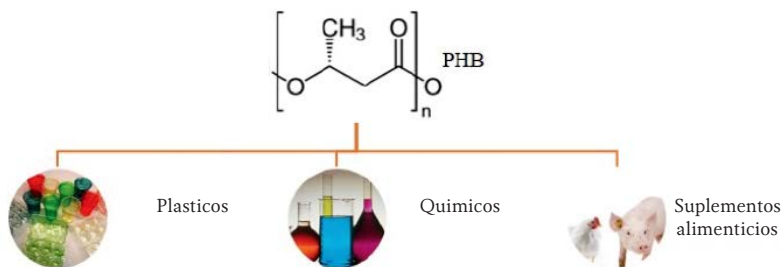
ambientales. Los nanobiosensores pueden detectar, por ejemplo, contaminantes como microorganismos y plagas, contenido de nutrientes y el estrés de las plantas por sequía y temperatura. Así, los agricultores pueden aplicar nutrientes, agua o sustancias para la protección del cultivo (herbicidas, pesticidas o fungicidas) de manera más eficiente. Más aún, se podrían emplear sensores autónomos inteligentes vinculados a un sistema de posicionamiento global (GPS) para un monitoreo en tiempo real de las condiciones del suelo y el cultivo a lo largo del predio. De esta manera, los nanobiosensores en conjunto con la agricultura de precisión pueden conducir a una mayor productividad al ayudar a los agricultores a la toma de decisiones. En ciertas partes de Estados Unidos y Australia ya se han instalado sensores inalámbricos, como en algunos viñedos de California.

AGRICULTURA SUSTENTABLE.

El descubrimiento de nuevos genes, la ingeniería genética de plantas y los estudios metabolómicos, han provocado el aumento de la producción agrícola, e incluso se han utilizado para obtener nuevos componentes no vegetales, algunos de los cuales pueden incluso sustituir a materiales derivados del petróleo que se producen en plantas transgénicas. Así, mediante el modelamiento de plantas transgénicas, preferentemente de cultivos no alimentarios, se pueden obtener numerosos nuevos polímeros, como termoplásticos biodegradables y polisacáridos para purificación por bioafinidad, así como proteínas de interés agropecuario, industrial y ambiental, que incluyen diversas enzimas (por ejemplo, celulasas y xilanasas para tratar residuos de papel) y proteínas fibrosas con propiedades específicas (por ejemplo, elastina y seda).

La producción a gran escala de polihidroxialcanoatos (PHAs) en plantas transgénicas puede proveer la cantidad necesaria para generar bioplásticos, bioquímicos y energía del sol y el CO₂ atmosférico. Los PHAs son una clase de biopolímeros con diversas longitudes de cadena que son producidos naturalmente por algunos microorganismos como materiales para almacenamiento de carbono. El polihidroxibutirato (PHB) es el PHA más simple de los materiales microbianos de almacenamiento de carbono y energía, y sus propiedades lo hacen funcionalmente similar a muchos plásticos derivados del petróleo, pero pueden ser degradados más fácilmente en ambientes activos biológicamente (Figura 3).

Figura 3. DIVERSOS PRODUCTOS QUE SE PUEDEN OBTENER DEL PHB.



Por otro lado, sistemas de producción neutrales de bióxido de carbono pueden ser desarrollados para la obtención sustentable de biomasa fibrosa y biocombustibles por métodos biotecnológicos. Se ha demostrado también las implicaciones ambientales del uso de biofertilizantes a largo plazo, contrarrestando a los efectos adversos de los agroquímicos. Así, la utilidad de los biofertilizantes va más allá que sólo incrementar la fertilidad de suelos, sino que también aumenta las fracciones estables de materia orgánica, las cuales son más resistentes a descomposición. Este efecto se debe principalmente a la influencia de los biofertilizantes en la aceleración de la humificación de la materia orgánica fresca que se introduce al suelo. Por lo tanto, la aplicación de biofertilizantes compuestos de microorganismos que aceleren dicha transformación de la biomasa puede emplearse para secuestrar el carbono en el suelo y así disminuir la concentración de dióxido de carbono atmosférico y contribuir a la mitigación el cambio climático. Adicionalmente, la aplicación de fertilizantes biológicos puede disminuir la contaminación del agua e incluso se pueden aplicar más eficientemente abonos orgánicos.

Además de las cuestiones de producción, es importante la conservación de la biodiversidad natural. Existen investigaciones que establecen los mecanismos para incrementar la producción de cultivos como pastos empleados como forraje en comunidades de pastizales de alta densidad y bajo nivel de entrada, que proporcionan tanto una alta biodiversidad como garantizan altos rendimientos de producción [9]. Con este tipo de investigaciones están surgiendo nuevos sistemas de producción emergentes que combinan aspectos de biodiversidad y biotecnología.

PERSPECTIVAS

A pesar de la gran utilidad de los biofertilizantes y biopesticidas, la baja eficiencia de los productos bajo condiciones desfavorables, la alta demanda, la fácil regulación de los fertilizantes y pesticidas sintéticos y la poca conciencia de los agricultores acerca de los beneficios y el modo de empleo de los insumos agrícolas biotecnológicos son aún algunas restricciones claves para la comercialización de estos productos. Adicionalmente, muchos productos biotecnológicos derivados de fermentaciones son moléculas complejas presentes en mínimas concentraciones y su purificación es difícil a gran escala; además, muchas veces son inestables bajo condiciones no controladas, por lo que su utilidad puede ser deficiente. Sin embargo, su eficacia puede incrementarse a través de distintas estrategias que favorezcan su estabilidad y especificidad, como la micro o nanoencapsulación. Por lo tanto, son necesarias nuevas investigaciones que permitan estabilizar los microorganismos benéficos y metabolitos secundarios de plantas y microorganismos que les permitan resistir condiciones ambientales adversas y aumentar así su confiabilidad en el mercado.

En el futuro, la resistencia a virus, hongos y bacterias o sus vectores puede darse por la expresión de genes de resistencia naturales o insertados en las plantas. La ingeniería genética representa así una oportunidad de proveer de genes resistencia a especies de plantas que no los desarrollen por sí solos, o para reforzar la resistencia parcial por el uso de secuencias específicas que actúen contra los vectores o patógenos que operen por medio de silenciamiento

de ARN. Cabe destacar que la eficacia de los cultivos GM depende de la transformación y regeneración del tejido es exitosa, lo que aún es difícil de conseguir con plantas leñosas como las parras y las grosellas. Los nanocuerpos, un nuevo tipo de anticuerpos que carece de la cadena ligera y los dominios ligados a los antígenos variables antivirales, han demostrado su eficacia para inactivar virus humanos de ADN o ARN, por lo que pueden tener un gran potencial para atacar virus de plantas. Sin embargo, uno de los grandes retos de la nanobiotecnología y la ingeniería genética es la aceptación de la sociedad, por lo cual se requieren más estudios de su efecto ambiental y en la salud humana a largo plazo para lograr la aprobación del sector comercial. La concientización pública sobre las ventajas y desafíos de estas tecnologías emergentes también contribuirá a una mayor aceptación en corto plazo.

Por su parte, para lograr una comercialización exitosa del PHB y sus productos a partir de plantas transgénicas, se requiere optimizar su producción para obtener un mayor rendimiento del producto (>10% del peso seco) y disminuir las penalizaciones agronómicas, ya que la acumulación de PHB en los tejidos vegetales por encima de ciertos niveles puede causar cambios en el crecimiento y el metabolismo de la planta.

Además, se requiere mayor inversión pública y privada para la investigación y desarrollo de productos y tecnologías biotecnológicas innovadoras que favorezcan al sector agrícola, un sector prioritario a nivel mundial.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2009. How to Feed the World in 2050. http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf (Accesado 21-03-2017).
- [2] Moshelion, Menachem; Altman, Arie. 2015. Current challenges and future perspectives of plant and agricultural biotechnology, *Trends Biotechnol.* 1–6.
- [3] Food and Agricultural Organization - International Atomic Energy Agency. Plant Breeding and Genetics, <http://www.naweb.iaea.org/nafa/pbg/index.html> (Accesado 21-03-2017).
- [4] Brookes, Graham; Barfoot, Peter. 2013. The global income and production effects of genetically modified (GM) crops 1996–2011, *GM Crops Food.* 4: 74–83.
- [5] Sharma, Arun K.; Sharma, Manoj K. 2009. Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities, *Biotechnol. Adv.* 27: 811–832.
- [6] Tarafdar, J.C.; Raliya, Ramesh; Mahawar, Himanshu; Rathore, Indira. 2014. Development of Zinc Nanofertilizer to Enhance Crop Production in Pearl Millet (*Pennisetum americanum*). *Agric. Res.* doi:10.1007/s40003-014-0113-y.
- [7] Chinnamuthu, C.R.; Murugesu Boopathi, P. 2009. Nanotechnology and Agroecosystem. *Madras Agric. J.* 96: 17–31.
- [8] Weigelt, A.; Weisser, W.W.; Buchmann, N.; Scherer-Lorenzen, M. 2009. Biodiversity for multifunctional grasslands: equal productivity in high-diversity low-input and low-diversity high-input systems. *Biogeosciences.* 6: 1695–1706.