



LIGA AGRÍCOLA INDUSTRIAL DE LA CAÑA DE AZÚCAR

**DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN
DE LA CAÑA DE AZÚCAR**

**PROGRAMA NACIONAL DE PRODUCTOS
Y DESARROLLO DE INSUMOS BIOTECNOLÓGICOS**

INFORME DE RESULTADOS AÑO 2019



**San José, Costa Rica
Mayo 2020**

INDICE

	Página
PRESENTACIÓN	4
PARTICIPANTES	5
INTRODUCCIÓN	6
1. UNIDAD DE PRODUCCIÓN DE CONTROLADORES BIOLÓGICOS	7
1.1. PRODUCCIÓN ANUAL DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS	7
1.2. COBERTURA ANUAL CON HONGOS ENTOMOPATÓGENOS	9
1.3. COBERTURA HISTÓRICA DEL PROGRAMA DE PRODUCCIÓN DE HONGO ENTOMOPATÓGENOS. PERÍODO 1989-2019	14
1.4. PRODUCCIÓN ANUAL DEL PARASITOIDE <i>Cotesia flavipes</i>	19
1.5. COBERTURA ANUAL CON EL PARASITOIDE <i>Cotesia flavipes</i>	20
1.6. COBERTURA HISTÓRICA DEL PROGRAMA DE PRODUCCIÓN DEL PARASITOIDE <i>Cotesia flavipes</i> . PERÍODO 1984-2019	23
2. PLANTA DE PRODUCCIÓN DE SUSTRATOS PARA SIEMBRA EN VIVERO	28
2.1. PRODUCCIÓN Y UTILIZACIÓN DE SUSTRATOS DURANTE EL AÑO 2019	28
2.2. REGISTROS DE UTILIZACIÓN DE SUSTRATOS. PERÍODO 2017-2019	29
3. PROPUESTAS TÉCNICAS PARA LA ASIGNACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO Y SUSTRATOS PARA SIEMBRA.	31
3.1. Metodología	31
3.2. Caso de Hongos Entomopatógenos	32
3.3. Caso del parasitoide <i>Cotesia flavipes</i>	37
4. ACTIVIDADES RELACIONADAS A LA MEJORA DE LA INFRAESTRUCTURA PROCESO DE LAS UNIDADES PRODUCTIVAS DE AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO Y SUBSTRATOS PARA SIEMBRA DURANTE EL AÑO 2019	42
4.1. Visión integral de la problemática en la producción de <i>Cotesia flavipes</i> durante el año 2019, asociada a la presencia de microsporidios (<i>Nosema</i> sp) y otros contaminantes.	42
4.1.1. ANTECEDENTES	42
4.1.2. FACTORES QUE HAN LIMITADO LA PRODUCCIÓN DE <i>Cotesia flavipes</i> DURANTE EL AÑO 2019.	44
4.1.2.1. Deficiente calidad de las masas de huevos de <i>Diatraea saccharalis</i> .	44
4.1.2.2. Contaminación de vasos con dieta de iniciación.	45
4.1.2.3. Deficiente desarrollo de larvas.	47
4.1.2.4. Baja eficiencia en parasitación.	48
4.1.2.5. Baja calidad de masas de pupas de <i>Cotesia flavipes</i> .	49
4.1.2.6. Baja proporción hembras/machos de <i>Cotesia flavipes</i> .	50
4.1.2.7. Presencia ambiental de microorganismos contaminantes.	51
4.2. ACCIONES DE PREVENTIVAS Y PALIATIVAS IMPLEMENTADAS DURANTE 2018 Y 2019.	52
4.2.1. Reforzamiento en los controles para evitar el ingreso de contaminantes.	52
4.2.2. Adquisición de lavadora industrial para lavado y desinfección de cajitas de poliestireno para la crianza de <i>Diatraea saccharalis</i> .	52
4.2.3. Adquisición de cámara de flujo laminar doble para preparación de dieta e inoculación de huevos en frascos.	53
4.2.4. Cambio de cielorraso y cambio de ventanas.	53
4.2.5. Reparación de estufa y certificación de crisálidas.	54
4.2.6. Ampliación de espacio para nacencia de adultos.	54
4.2.7. Implementación de certificación de ausencia de <i>Nosema</i> sp mediante técnicas de PCR de punto final.	55
4.2.8. Reducción de cantidad de pesajes de dieta y carga de esterilización de componentes de la dieta.	58
4.2.9. Reemplazo del algodón como tapa de frascos, por tapa plástica.	58
4.2.10. Evaluación preliminar de productos antiparasitarios, antibióticos y suplementos alimenticios como estimulantes para el aumento en peso de larvas de <i>Diatraea saccharalis</i>	60
4.2.11. Eficacia de antibióticos incorporados a la dieta de <i>Diatraea saccharalis</i> sobre la inhibición in vitro de <i>Serratia marcescens</i> y su posible efecto sobre los principales parámetros productivos del parasitoide <i>Cotesia flavipes</i>	61
4.2.12. Otras acciones importantes.	69
4.3. Resultados del proceso de reconstrucción y mejoramiento del proceso de producción de sustratos para siembra.	71
5. INVESTIGACIONES PARA EL DESARROLLO DE NUEVOS INSUMOS BIOTECNOLÓGICOS A BASE DE MICROORGANISMOS CON EFECTO BIOESTIMULANTE Y BIOFERTILIZANTE PARA EL CULTIVO DE LA CAÑA DE AZÚCAR.	74
5.1. Desarrollo de un protocolo para la producción masiva del hongo <i>Trichoderma</i> sp.	74
5.2. Evaluación de la patogenicidad de hongos entomopatógenos como agentes de control de jobotos, <i>Phyllophaga</i> spp., bajo condiciones de vivero con plantas de maíz (<i>Zea mays</i>).	80
5.3. COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS.	85

6.	INVESTIGACIÓN DIRIGIDA HACIA EL DESARROLLO DE INSUMOS BIOLÓGICOS BIOFERTILIZANTES Y DE TECNOLOGÍAS PARA EL MEJORAMIENTO DE LA SALUD DEL SUELO CAÑERO.	87
6.1.	Selección de hongos y bacterias promotoras de crecimiento vegetal a nivel de vivero, para el desarrollo de bioestimulantes en la producción sostenible de la caña de azúcar.	87
6.2.	Efecto del biocarbón y otros insumos biológicos sobre la producción y fitosanidad de la caña de azúcar en el ingenio Taboga, Cañas, Guanacaste.	98

PRESENTACIÓN

Los profundos cambios que de manera sistemática y creciente se vienen experimentando en los diferentes entornos agro productivos de caña de azúcar en Costa Rica; algunos de los cuales han impactado severamente la producción y desestabilizado la agroindustria, ameritan y justifican el empleo de estrategias y medidas diferentes destinadas a favorecer su control mediante el empleo de tácticas y destrezas ajustadas a los principios que pregona y sustenta el Desarrollo Sostenible.

Por muchos años el sector azucarero costarricense ha desarrollado, promovido y consolidado con gran capacidad, iniciativas tecnológicas modernas y muy pragmáticas, orientadas a resolver, mitigar o atenuar la afectación y el impacto que algunas limitantes fitosanitarias asociadas a plagas provocan en nuestras plantaciones comerciales. Algunas de esas iniciativas son pioneras no solo en el ámbito cañero sino también en la agricultura nacional virtud de su novedad y efectividad. Tópicos vinculados con la multiplicación en el laboratorio de hongos entomopatógenos de los géneros *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y la avispa parasitoide del género *Cotesia flavipes*, forman parte, entre otras especies, de los productos biológicos desarrollados y puestos a disposición del agricultor. La producción de Substrato Orgánico, forma parte también de la oferta biológica puesta a disposición del sector productor de caña.

El **Programa de Producción y Desarrollo de Insumos Biotecnológicos** de DIECA, expone a continuación los resultados más notables alcanzados con gran esfuerzo a nivel de laboratorio y planta durante el año 2019, en varias áreas de gestión temática, en lo pertinente a la reproducción de hongos entomopatógenos, multiplicación de parasitoides y fabricación de substratos orgánicos. Dichos resultados han sido posibles gracias al trabajo constante, profesional y de calidad promovido por los funcionarios a cargo de los proyectos y, también, de los referentes regionales que han contribuido con la labor de liberación, aplicación y monitoreo de campo. Lo anterior fue posible gracias al apoyo brindado por los Ingenios, Productores Independientes y Cámaras de Productores, entre otros; a quienes externamos nuestro reconocimiento y muy sincero agradecimiento.

Ing. Agr. Marco A. Chaves Solera, MSc.

Gerente DIECA

PARTICIPANTES

La labor de investigación de campo fue desarrollada por los siguientes funcionarios:

Ing. Agr. Alejandro Rodríguez Morales M.Sc.	Jefe de Programa Nacional de Productos Biotecnológicos
Ing. Agr. Ana Isabel Alpízar Alfaro	Encargada de Control de Calidad
Lic. Biol. Karen Oviedo Bolaños	Encargada del Laboratorio de Biología Molecular
Ing. Agr. José D. Salazar Blanco	Jefe de Programa Fitosanidad
Ing. Agr. Eduardo Cadet Piedra	Asistente Programa Fitosanidad
Tec. Agrop. Rodrigo Oviedo Alfaro	Asistente Programa Fitosanidad
Ing. Agr. Javier Bolaños Porras	Coordinador Región Valle Central
Ing. Agr. Julio Cesar Barrantes Mora	Coordinador Región Sur
Ing. Agr. Elberth Barquero Madrigal	Coordinador Región Norte
Ing. Agr. Gilberto Calderón Araya	Coordinador Región Turrialba
Ing. Agr. Alvaro Angulo Marchena	Coord. Región de Guanacaste (Cañas)
Ing. Agr. Manuel Rodríguez Rodríguez	Coord. Región de Guanacaste (Liberia)

Se agradece profunda y sinceramente la valiosa colaboración brindada por el personal de apoyo del Departamento de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar (DIECA), principalmente a la Ing. Ana Isabel Alpízar Alfaro por su gran apoyo en muchas de las actividades productivas y de investigación consignadas en este informe. Igual agradecimiento a los estudiantes Mercedes Castro Mena y José Vargas Badilla, quienes realizaron estudios de gran importancia para el mejoramiento de los procesos productivos en el laboratorio de producción de hongos entomopatógenos. Asimismo, se agradece al personal técnico destacado en las regiones cañeras del país y a nuestros colaboradores en los distintos ingenios y fincas cañeras por su gran colaboración en el desarrollo de nuestras actividades.



Introducción

Conforme a los lineamientos y propuestas derivadas del estudio de estado del arte realizado en el año 2018, mediante el cual se identificó el estado del arte en el desarrollo de productos biotecnológicos para uso en el cultivo de la caña de azúcar, durante el año 2019 se continuó la labor de bioprospección de microorganismos con potencial en todas las regiones cañeras del país. Esta labor permitió alcanzar casi las 200 obtenciones con lo cual se espera en un mediano plazo generar soluciones naturales a muchos de los problemas que afronta actualmente el cultivo y que afrontará en un futuro cercano en materia de sostenibilidad ambiental, técnica y económica.

Los grupos de microorganismos más significativos son los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*; los hongos bioestimulantes y antagonistas como *Trichoderma* y diferentes géneros de bacterias, principalmente asociadas al género *Bacillus*.

Se proyecta tal como se informa en este documento, diseñar estrategias para seleccionar a los aislamientos más promisorios, integrarlos en un sistema de escalamiento y formulación en biofábricas, y finalmente, evaluarlos a nivel de campo con la esperanza de que algunos logren sustituir o al menos complementar, la aplicación de productos de síntesis química como insecticidas y fertilizantes.

Desde otro frente, se trabaja en sistemas para mejorar la salud y calidad del suelo cañero enfocándose en la adición de enmiendas a base de biocarbón (biochar) con el objeto de incrementar los niveles de materia orgánica y con esto, la intensidad de los ciclos biogeoquímicos, poniendo disponibles elementos esenciales para la nutrición y sanidad del cultivo.

Para esta labor se está en proceso de adquisición de un horno para producir biocarbón y poder establecer parcelas de validación en diferentes regiones del país. Está ampliamente documentado que la adición de biocarbon favorece la aireación del suelo, disminuye la densidad de suelos pesados, aumenta la retención de agua, incrementa la capacidad de intercambio catiónico y regula el pH. En materia ambiental, la contribución del biocarbón se mide por su alta estabilidad en el suelo, contribuyendo esto a su recarbonización y por ende, a fijar Gases con Efecto Invernadero (GEIs) como CO₂ y el Metano.

Finalmente en este informe se reportan los niveles productivos y la cobertura con hongos entomopatógenos, el parasitoide *Cotesia flavipes* y con substratos para siembra, haciendo referencia a los principales puntos de mejora en los diferentes procesos.



1. UNIDAD DE PRODUCCIÓN DE CONTROLADORES BIOLÓGICOS.

Alejandro Rodríguez Morales



1.1. PRODUCCIÓN ANUAL DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS.

Durante el año 2019 se produjo un total de 24.817,2 kg de hongo sobre sustrato de arroz, siendo los meses de abril a octubre, los picos más altos de producción. Debido al cambio del cielo raso y las puertas en el laboratorio de producción, los primeros 3 meses del año no se produjo este bioinsumo.

La cepa D 0317 del hongo *Metarhizium anisopliae* fue la más reproducida con un total de 20.909,2 kg, lo cual representó el 84,22% del total reproducido durante el año; esta cepa es utilizada en el cultivo de la caña de azúcar y en pasturas, principalmente para el control del salivazo (*Aeneolamia* spp, *Prosapia* sp y *Zulia* sp), en las regiones Norte, Puntarenas y Guanacaste.

La segunda cepa más reproducida fue D 0117 del hongo *Beauveria bassiana* con un total de 3.868,8 kg, lo cual representó el 30,80% del total; esta cepa se utiliza principalmente para el control de la chinche de encaje (*Leptodyctia tabida*) en la región de Guanacaste, pero también para el control del áfido amarillo (*Sipha flava*), el picudo rayado (*Metamasius hemipterus*) y el gusano cogollero (*Spodoptera* sp), en varias regiones del país. Asimismo, parte de la producción de este hongo se utilizó en el control de plagas de pastos como el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), la chinche de los pastos “blissus” (*Blissus* sp) y el salivazo (*Prosapia* spp). En tercer y cuarto lugar se reprodujeron las cepas AFI (*Beauveria bassiana*) y LECA (*Lecanicillium lecanii*), con un total de 30,8 kg (0,12%) y 8,4 kg (0,03%), respectivamente, las cuales se aplicaron experimentalmente para el control del áfido amarillo (*Sipha flava*) en la región del Valle Central.

Respecto a la especie de hongo, 20.909,9 kg correspondieron a *M. anisopliae* (84,22%); 3.899,6 kg (15,70%) correspondieron a *B. bassiana* y 8,4 kg (0,03) a *L. lecanii*. La pérdida de bolsas por defectos en la calidad fue mínima, alcanzando un peso de 8,8 kg (0,04%).

La Figura 1 muestra gráficamente las cantidades mensuales producidas según hongo y

cepa; claramente se observa que los meses de abril a octubre fueron los de mayor producción, fluctuando entre los 1.077,2 kg (abril) y los 3.528,0 kg (octubre); *M. anisopliae* se produjo durante todo este período, mientras que *B. bassiana* se produjo principalmente durante los meses de julio y agosto para el control de *S. flava* y en noviembre para el control de *L. tabida*. Por su parte, la Figura 2 muestra la distribución porcentual anual de la producción según hongo y cepa y la Figura 3 muestra el mismo dato pero de acuerdo a la especie de hongo.

CUADRO 1.
Producción mensual de hongos entomopatógenos según especie durante el año 2019.
Datos referidos a hongo sobre sustrato (kg).

MES	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Beauveria bassiana</i>		<i>Lecanicillium lecanii</i>	BOLSAS PERDIDAS
	D 0317	D 0117	AFI	LECA	
Enero	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Febrero	0,0	0,0	0,0	8,4	8,8
Marzo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Abril	1.077,2	0,0	0,0	0,0	0,0
Mayo	2.553,2	426,0	0,0	0,0	0,0
Junio	3.407,2	0,0	0,0	0,0	0,0
Julio	3.349,6	909,2	30,8	0,0	0,0
Agosto	2.608,8	1.407,2	0,0	0,0	0,0
Septiembre	3.427,6	0,0	0,0	0,0	0,0
Octubre	3.528,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Noviembre	957,6	1.126,4	0,0	0,0	0,0
Diciembre	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TOTAL/CEPA	20.909,2	3.868,8	30,8	8,4	8,8
% CEPA	84,22	15,58	0,12	0,03	0,04
TOTAL ESPECIE	20.909,2	3.899,6		8,40	8,80
% ESPECIE	84,22	15,71	0,00	0,03	0,04

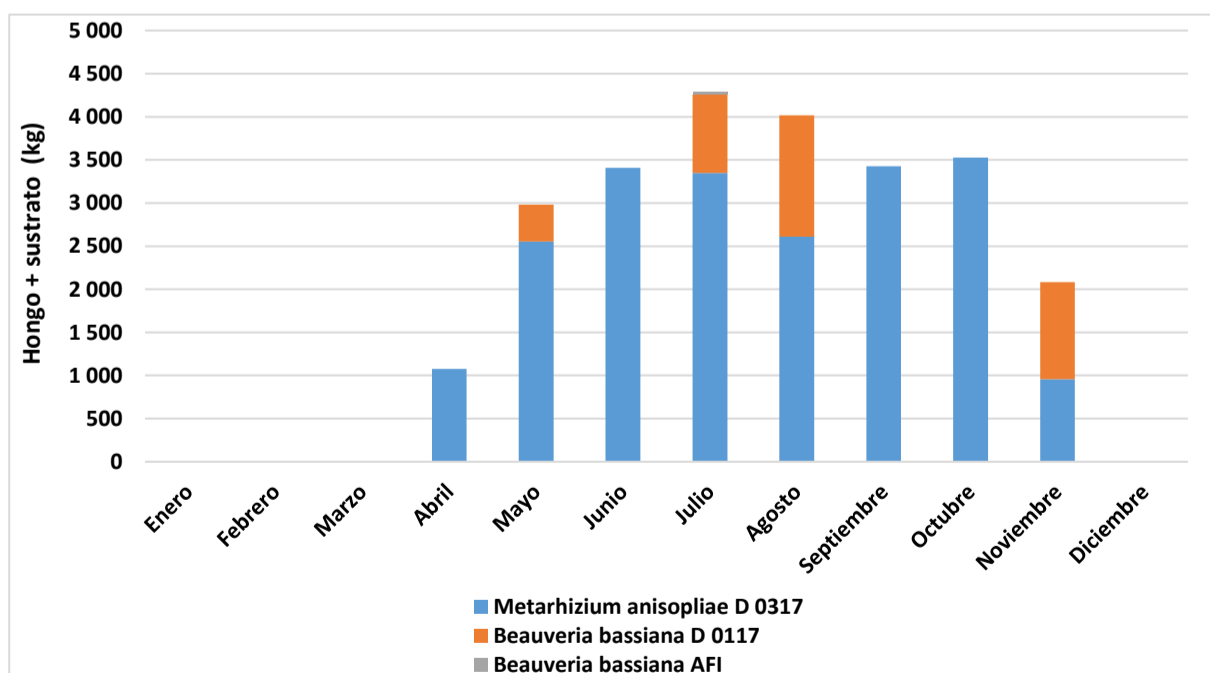


FIGURA 1.
Distribución mensual de la producción de hongos entomopatógenos según hongo y cepa.
Año 2019.

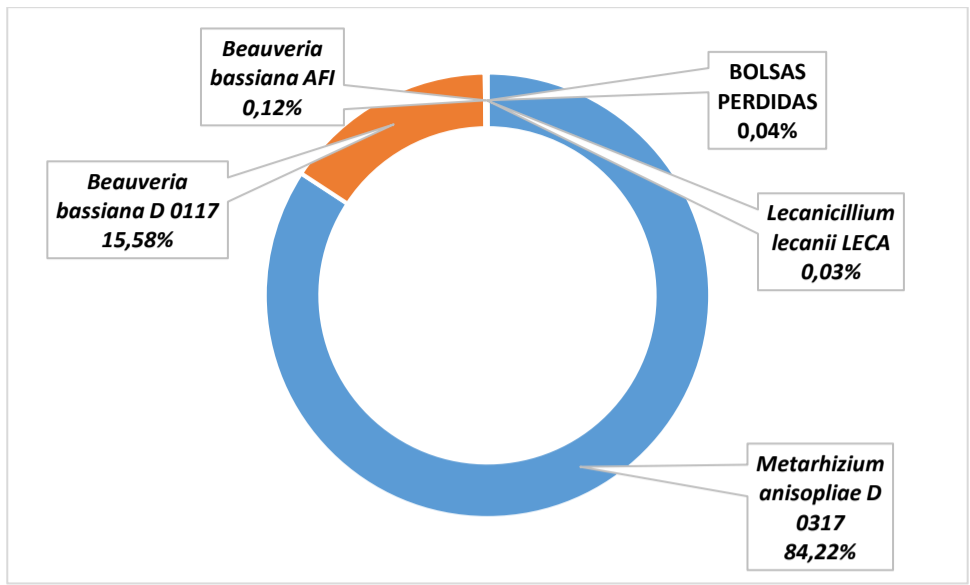


FIGURA 2.
Producción porcentual anual de hongos entomopatógenos según especie de hongo y cepa. Año 2019.

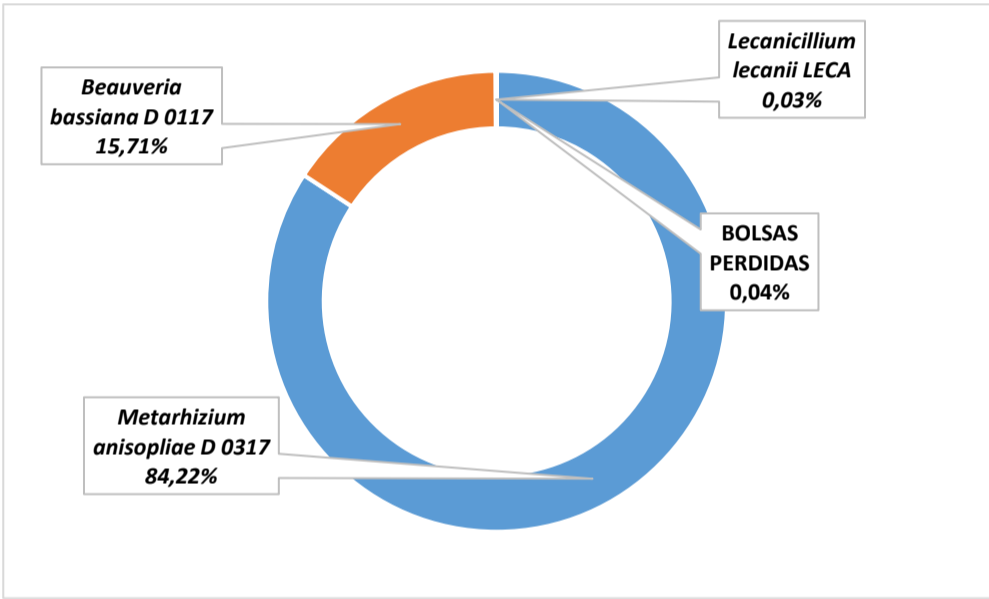


FIGURA 3.
Producción porcentual anual de hongos entomopatógenos según especie de hongo. Año 2019.

1.2. COBERTURA ANUAL CON HONGOS ENTOMOPATÓGENOS.



La liberación de hongos entomopatógenos durante el año 2019 alcanzó los 27.525,0 kg, volumen que sirvió para atacar problemas de plagas en un total de 5.505,0 ha en todas las regiones cañeras del país (Cuadro 2).

Los principales beneficiarios del programa fueron el ingenio El Palmar, el ingenio Cutris y los productores de la zona Norte, hacia quienes se destinó un total de 8.954,0 kg, 5.402,0 kg y 4.678,0 kg, respectivamente, correspondiendo esto al 32,53%, 19,63% y 17,00%, del total anual aplicado (Cuadro 2). Este material biológico fue utilizado principalmente para la atención del salivazo (*Aeneolamia* sp, *Prosapia* sp, *Zulia* sp) mediante el hongo *Metarhizium anisopliae*, pero también para la atención de la chinche de encaje, *Leptodyctia tabida*, con el hongo *Beauveria bassiana*, como fue el caso del ingenio Taboga. Los ingenios Taboga, CoopeVictoria y Quebrada Azul, utilizaron 3.149,0 kg (11,44%), 1.383,0 kg (5,02%) y 1.350,0 kg (4,90%), ubicándose en las posiciones cuatro, cinco y seis dentro de los beneficiarios del programa.

Las ventas totales (internas y exportaciones) para el control de plagas en diferentes cultivos (fresa, hortalizas y pastos, principalmente,), así como las exportaciones al Ingenio Alanje (Panamá) para el control de salivazo, alcanzaron en conjunto los 1.321,0 kg (4,80% del total).

Otros usuarios habituales que utilizaron cantidades menores de hongos, fueron los productores ubicados en la zona de Cañas y Bagaces, quienes acumularon un total de 387,0 kg (1,41%), principalmente para el control de la chinche de encaje (*L. tabida*); las labores de investigación, demostraciones de método y donaciones, las cuales alcanzaron en conjunto los 321,0 kg (1,17%); los productores de la Zona Sur (Pérez Zeledón) con 213,0 kg (0,77%), para atender brotes con el áfido amarillo (*S. flava*), el picudo rayado (*Metamasius hemipterus*) y los jobotos (*Phyllophaga* spp). El ingenio CATSA que había cesado el uso de estos productos por varios años, reanudó su utilización para el control de la chinche de encaje, para lo cual utilizó un total de 160,0 kg (0,58%):

Usuarios frecuentes que tradicionalmente utilizan ocasionalmente los hongos fueron los productores de la zona de Cañas y Bagaces, el ingenio El Viejo, principalmente como colaboración en el control de plagas insectiles en los proyectos de hortalizas y uva, en donde se presentaron brotes de mosca blanca y gusano cogollero. Igualmente el ingenio CoopeAgri y los productores en Puntarenas, aplicaron cantidades pequeñas de hongos para el control de áfidos y chinche de encaje. El Cuadro 2 muestra las cantidades de hongos aplicado según usuario y región, así como la cobertura brindada en cada caso.

CUADRO 2.
Cobertura del programa de producción de hongos entomopatógenos
según beneficiario y región.

BENEFICIARIO	DESTINO	HONGO + SUBSTRATO (kg)	AREA (ha)	%
Ingenio El Palmar	Pacífico Central	8.954,0	1.790,8	32,53
Ingenio Cutris	Norte	5.402,0	1.080,4	19,63
Productores Zona Norte	Norte	4.678,0	935,6	17,00
Ingenio Taboga	Guanacaste	3.149,0	629,8	11,44
Ingenio Coopevictoria	Valle Central	1.383,0	276,6	5,02
Ingenio Quebrada Azul	Norte	1.350,0	270,0	4,90
Ventas	Nacional y Exportación	1.321,0	264,2	4,80
Prod. Cañas, Bagaces	Guanacaste	387,0	77,4	1,41
Invest., donación, demos.	Varios	321,0	64,2	1,17
Productores Pérez Zeledón	Sur	213,0	42,6	0,77
Ingenio CATSA	Guanacaste	160,0	32,0	0,58
Productores Valle Central	Valle Central	71,0	14,2	0,26
Ingenio Coopeagri	Sur	60,0	12,0	0,22
Productores Puntarenas	Pacífico Central	31,0	6,2	0,11
Prod. Liberia, Sta. Cruz, Carrillo	Guanacaste	25,0	5,0	0,09
Ingenio El Viejo	Guanacaste	20,0	4,0	0,07
TOTAL	-	27.525,0	5.505,0	100,0

Regionalmente, de acuerdo al tipo de beneficiario (productores independientes, ingenios, ventas y otros), el Cuadro 3 muestra que en la región Norte, a nivel de productores, se destinó un total de 4.678,0 kg (17,0%); mientras que a nivel de ingenios, se aplicó 6.752,0 kg (24,5%).

En la región de Puntarenas se aplicó únicamente 31,0 kg (0,1%) de hongo a nivel de productores; mientras que a nivel de ingenios (El Palmar), se aplicó 8.954,0 kg (32,5%). En la región de Guanacaste se aplicó 412,0 kg (1,5%) entre productores y 3.329,0 kg (12,1%) a nivel de ingenios. En la región Sur del país se aplicó 213,0 kg (0,8%) a nivel de productores y en fincas del ingenio CoopeAgri se aplicó 60,0 kg (0,2%).

En el Valle Central, se aplicó 71,0 kg (0,3%) a nivel de productores y 1.383,0 kg (5,0%) a nivel de ingenios de la zona. En cuanto a ventas (internas y exportaciones), como se indicó anteriormente, éstas ascendieron a los 1.321,0 kg (4,8%) y finalmente, para otros usos en investigación, demostración y donaciones, se utilizó un total de 321,0 kg (1,2%).

CUADRO 3

Cobertura del programa de producción de hongos entomopatógenos según tipo de beneficiario y región. Año 2019.

Región	Tipo de Beneficiario	Hongo + substrato (kg)	Área (ha)	%
Norte	Productores	4.678,0	935,6	17,0
	Ingenios	6.752,0	860,4	24,5
Puntarenas	Productores	31,0	6,2	0,1
	Ingenios	8.954,0	1 790,8	32,5
Guanacaste	Productores	412,0	82,4	1,5
	Ingenios	3.329,0	665,8	12,1
Sur	Productores	213,0	42,6	0,8
	Ingenios	60,0	12,0	0,2
Valle Central	Productores	71,0	14,2	0,3
	Ingenios	1.383,0	276,6	5,0
Otros	Inv., donac., demo.	321,0	64,2	1,2
Ventas	Internas y Export.	1.321,0	264,2	4,8
TOTAL		27.525,0	5.505,0	100,0

Según se detalla en el Cuadro 4, a nivel de regional, la Región Norte utilizó la mayor cantidad de hongos durante el año 2019, principalmente para el combate del salivazo y en menor grado para el control de la cigarrita antillana (*Saccharosydne saccharivora*), el áfido amarillo (*S. flava*), el barrenador gigante (*Telchin atymnius*) y el picudo rayado (*M. hemipterus*). Para esta tarea en la zona se aplicó un total de 11.430,0 kg, abarcando un área de cobertura de 2.286,0 ha y representando esto el 41,53% del total liberado.

En segundo lugar, la región del Pacífico Central, principalmente debido a los brotes continuos del salivazo en fincas del ingenio El Palmar, debió aplicar un total de 8.985,0 kg en un área de 1.797, ha, correspondiendo esto al 32,64% del total. En tercer lugar la región de Guanacaste aplicó 3.741,0 kg de hongos en un área aproximadas a las 748,2 ha, lo que representó el 13,59% del total. En esta región la mayor cantidad de hongo se aplicó en fincas del ingenio Taboga, como respuesta a los ataques del salivazo (*Aeneolamia* spp) y la chinche de encaje (*L. tabida*). En el Valle Central se aplicó un total de 1.454,0 kg en un área de 290,8 ha, lo que representó el 5,28%, siendo que este material se destinó al control del áfido amarillo (*S. flava*) y en menor grado, al control de la cigarrita antillana (*S. saccharivora*).

Las ventas totales y el aprovechamiento de los hongos en investigación, demostración de método y donaciones, como se mencionó, alcanzaron los 1.321,0 kg (4,80%) y 321,0 kg (1,17%), respectivamente. Finalmente, se aplicó un total de 273,0 kg de hongos en un área de aproximadamente 54,6 ha, en la región Sur, enfocándose en el control del áfido, el picudo rayado y los jobotos (cuadro 4). La Figura 4 resalta de manera porcentual, las cantidades de hongos entomopatógenos destinadas según región.

CUADRO 4.
Cobertura del programa de producción de hongos entomopatógenos
según región. Año 2019.

PRODUCTORES	Hongo + substrato (kg)	ÁREA (ha)	%
Zona Norte	11.430,0	2.286,0	41,53
Puntarenas	8.985,0	1.797,0	32,64
Guanacaste	3.741,0	748,2	13,59
Valle Central	1.454,0	290,8	5,28
Ventas	1.321,0	264,2	4,80
Invest., donación, demos.	321,0	64,2	1,17
Sur	273,0	54,6	0,99
TOTAL	27.525,0	5.505,0	100

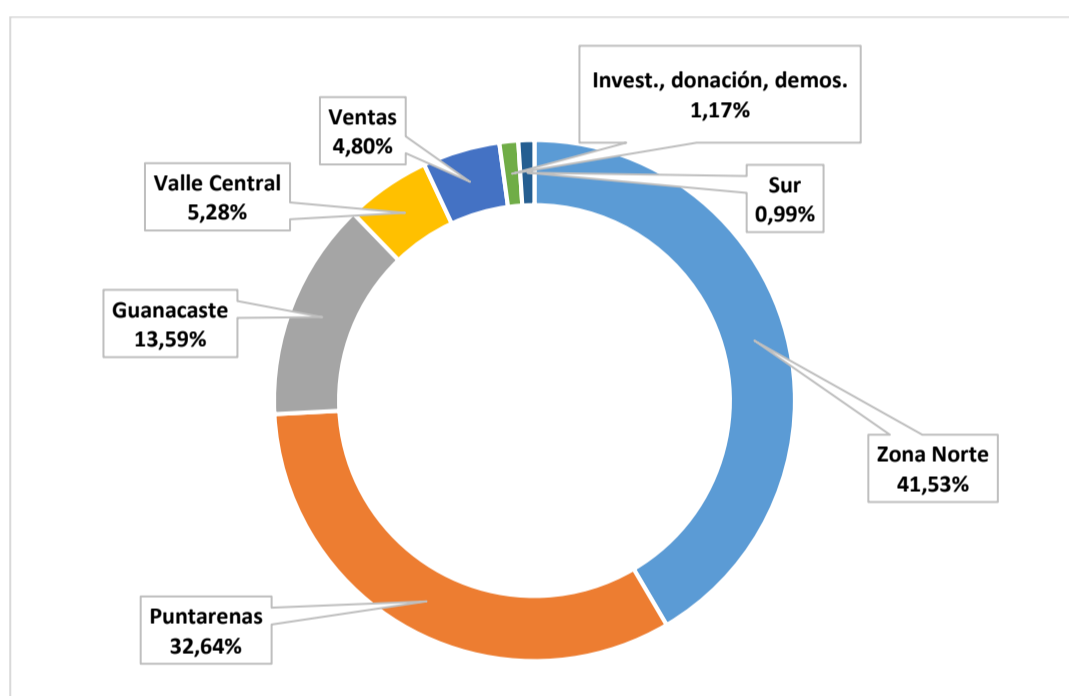


FIGURA 4.
Cobertura porcentual con hongos entomopatógenos según región. Año 2019.

A nivel nacional, de acuerdo al tipo de beneficiario, el Cuadro 5 y la Figura 5 muestran que los 8 ingenios del país a los cuales se les destinó hongos entomopatógenos durante el año 2018, acumularon un total de 16.884,5 kg, lo que correspondió al 76,2% del total liberado. Por su parte, los productores recibieron un total de 3.664,5 kg (16,5%); las ventas alcanzaron 1.477,0 kg (6,7%) y otros usos 132,7 kg (0,6%).

CUADRO 5.
Cobertura del programa de producción de hongos entomopatógenos
según tipo de beneficiario. Año 2019.

Beneficiario	Hongo + substrato (kg)	ÁREA (ha)	%
Ingenios	20.478,0	4.095,6	74,4
Productores	5.405,0	1.081,0	19,6
Ventas	1.321,0	264,2	4,8
Invest., donación, demostrac.	321,0	64,2	1,2
TOTAL	27.525,0	5.505,0	100,0

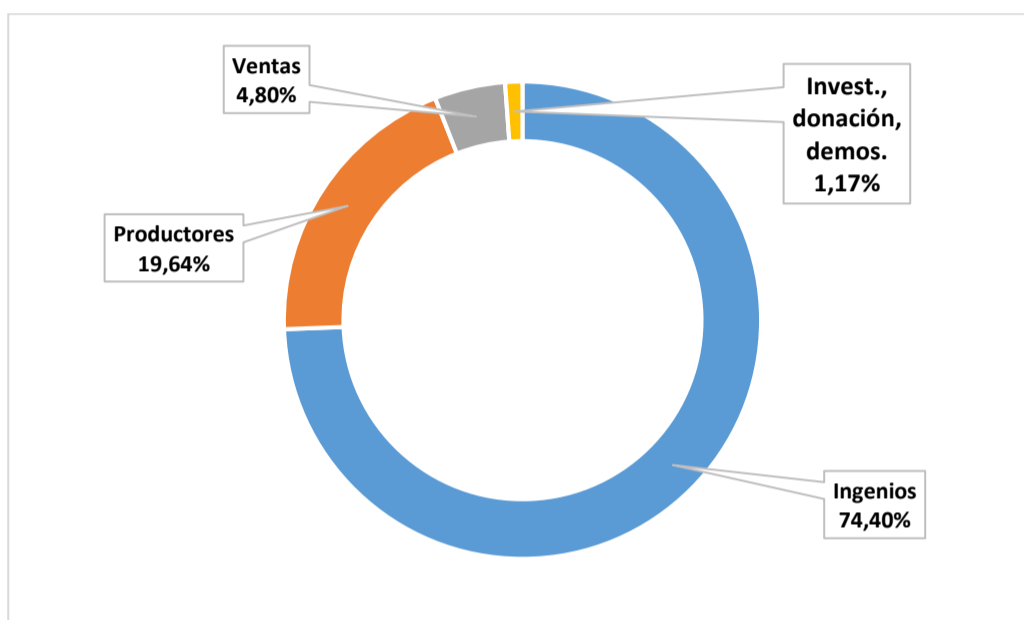


FIGURA 5.
Cobertura porcentual con hongos entomopatógenos según tipo de beneficiario. Año 2019.

1.3. COBERTURA HISTÓRICA DEL PROGRAMA DE PRODUCCIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS. PERÍODO 1989-2019.

Con los resultados anteriormente descritos para el año 2019, la cobertura histórica con hongos entomopatógenos durante el período 1989 - 2018, ascendió a 584.291,7 kg y a una cobertura total aproximada a las 116.858,3 ha. Durante este período de 31 años, los 10 beneficiarios en orden descendente que acumularon la mayor cantidad de hongos aplicados, fueron: 1) Ventas (internas y externas) con un total de 164.891,0 kg (28,448% del total); 2) Ingenio El Palmar con 83.563,5 kg (14,417%); 3) Productores de la Zona Norte con 76.254,5 kg (13,051%); 4) Ingenio Cutris con 54.268,0 kg (9,288%); 5) Ingenio Taboga con 38.960,0 kg (6,668%); 6) Ingenio Quebrada Azul 27.927,0 kg (4,780%), Ingenio Santa Fe (extinto) con 27.306 kg (4,673%);, 8) Productores independientes de la zona de Liberia, Santa Cruz y Carrillo con 23.169,0 kg (3,965%); 9) Azucarera El Viejo con 22.161,0 kg (3,793%) y 10) Productores independientes en la zona de Cañas, Bagaces y Abangares con 17.901,0 kg (3,064%). El Cuadro 6 muestra estos resultados y los obtenidos con otros beneficiarios menores.

CUADRO 6.
Cobertura histórica del programa de producción de hongos entomopatógenos
según beneficiario y región o destino. Período 1989 - 2019.

BENEFICIARIO	REGIÓN / DESTINO	Hongo + substrato (kg)	AREA (ha)	%
Ventas	Nacional y Export.	164.891,0	32.978,2	28,221
Ingenio El Palmar	Pacífico Central	83.563,5	16.712,7	14,302
Productores Zona Norte	Norte	76.254,5	15.250,9	13,051
Ingenio Cutris	Norte	54.268,0	10.853,6	9,288
Ingenio Taboga	Guanacaste	38.960,0	7.792,0	6,668
Ingenio Quebrada Azul	Norte	27.927,0	5.585,4	4,780
Ingenio Santa Fe	Norte	27.306,0	5.461,2	4,673
Prod. Liberia, Sta. Cruz, Carrillo	Guanacaste	23.169,0	4.633,8	3,965
Ingenio El Viejo	Guanacaste	22.161,0	4.432,2	3,793
Prod. Cañas, Bagaces	Guanacaste	17.901,0	3.580,2	3,064
Ingenio CATSA	Guanacaste	11.613,0	2.322,6	1,988
Ingenio Coopevictoria	Norte	6.830,0	1.366,0	1,169
Productores Puntarenas	Pacífico Central	6.776,0	1.355,2	1,160
Ingenio Coopecañera	Pacífico Central	6.000,0	1.200,0	1,027
Ingenio Coopeagri	Sur	5.050,0	1.010,0	0,864
Invest., donación, demos.	Nacional	3.207,7	641,5	0,549
Ingenio Providencia	Norte	2.916,0	583,2	0,499
Ingenio Juan Viñas	Turrialba	2.388,0	477,6	0,409
Productores Pérez Zeledón	Sur	1.451,0	290,2	0,248
Productores Valle Central	Valle Central	1.036,0	207,2	0,177
Ingenio Costa Rica	Valle Central	428,0	85,6	0,073
Ingenio Porvenir	Norte	121,0	24,2	0,021
Productores Turrialba	Turrialba	49,0	9,8	0,008
Ingenio La Argentina	Valle Central	25,0	5,0	0,004
TOTAL	-	584.291,7	116.858,3	100,0

Respecto al tipo de beneficiario y región, los productores de la Región Norte utilizaron un total de 76.254,5 kg (39,0% del total regional), para un área de cobertura estimada en 15.250,9 ha; mientras que los ingenios de la zona utilizaron 119.368,0 kg (61,0% regional), en un área estimada de 23.873,6 ha. En la Región de Guanacaste, los productores utilizaron 41.070,0 kg (36,1% regional), en un área estimada de 8.214,0 ha; mientras que los ingenios de la zona utilizaron 72.734,0 kg (36,9% del total), para un área aproximada de 14.546,8 ha. En la región de Puntarenas, los productores independientes utilizaron 6.776,0 kg (7,0%), en un área estimada de 1.355,2 ha; mientras que los ingenios de la zona (incluyendo al extinto ingenio Coopecañera), utilizaron un total de 89.563,5 kg (14,5%), para un área de cobertura estimada en 17.912,7 ha.

Con menores cantidades de hongo utilizado se registra la región Sur, cuyos productores aplicaron 1.451,0 kg (22,3%) en un área estimada de 290,2 ha; mientras que el ingenio de la zona (CoopeAgri), aplicó 5.050,0 kg (77,7%), para un área de 1.010,0 ha. En este rango se ubicó igualmente la región de Turrialba y Juan Viñas, cuyos los productores utilizaron únicamente 49,0 kg para un área de cobertura de 9,8 ha (2,0%); mientras que el ingenio de la zona (Hda. Juan Viñas), aplicó 2.388,0 kg (98,0%), para una cobertura de 477,6 ha. Finalmente, en el Valle Central los productores utilizaron 1.036,0 kg (69,6%), en un área aproximada de 207,2 ha; mientras que los ingenios de la zona aplicaron 453,0 kg (30,4%), en un área de 90,6 ha. El Cuadro 7 muestra detalladamente las cantidades utilizadas por región, según tipo de beneficiario, así como el área de cobertura correspondiente.

CUADRO 7.
Cobertura histórica del programa de producción de hongos entomopatógenos
según tipo de beneficiario y región. Período 1989-2019.

REGIÓN	TIPO DE BENEFICIARIO	Hongo + substrato (kg)	AREA (ha)	REGIÓN (%)
NORTE	Ingenios	119.368,0	23.873,6	61,0
	Productores	76.254,5	15.250,9	39,0
GUANACASTE	Ingenios	72.734,0	14.546,8	63,9
	Productores	41.070,0	8.214,0	36,1
PUNTARENAS	Ingenios	89.563,5	17.912,7	93,0
	Productores	6.776,0	1.355,2	7,0
SUR	Ingenios	5.050,0	1.010,0	77,7
	Productores	1.451,0	290,2	22,3
TURRIALBA	Ingenios	2.388,0	477,6	98,0
	Productores	49,0	9,8	2,0
VALLE CENTRAL	Ingenios	453,0	90,6	30,4
	Productores	1.036,0	207,2	69,6
VENTAS	-	164.891,0	32.978,2	28,2
OTROS	-	3.207,7	641,5	0,5
TOTAL		584.291,7	116.858,3	-

En el ámbito regional, el Cuadro 8 y la Figura 6 muestran que la región Norte acumuló 195.622,5 kg de hongos aplicados (33,48% del total histórico), para un área de cobertura de 39.124,5 ha; la región de Guanacaste aplicó un total de 113.804,0 kg (19,48%), para una cobertura de 22.760,8 ha; en Puntarenas se aplicó 96.339,5 kg (16,49%), en un área de 19.267,9 ha; la región Sur aplicó 6.501,0 kg (1,11%), para una cobertura de 1.300,2 ha; la región de Turrialba – Juan Viñas aplicó 2.437,0 kg (0,42%), para una cobertura de 487,4 ha; en la región del Valle Central se aplicó un total de 1.489,0 kg (0,25%), para una cobertura de 297,8 ha.

CUADRO 8.
Cobertura histórica del programa de producción de hongos entomopatógenos
según región. Período 1989-2019.

REGIÓN	Hongo + substrato (kg)	AREA (ha)	%
NORTE	195.622,5	39.124,5	33,48
GUANACASTE	113.804,0	22.760,8	19,48
PUNTARENAS	96.339,5	19.267,9	16,49
SUR	6.501,0	1.300,2	1,11
TURRIALBA	2.437,0	487,4	0,42
VALLE CENTRAL	1.489,0	297,8	0,25
VENTAS	164.891,0	32.978,2	28,22
OTROS	3.207,7	641,5	0,55
TOTAL	584.291,7	116.858,3	100,0

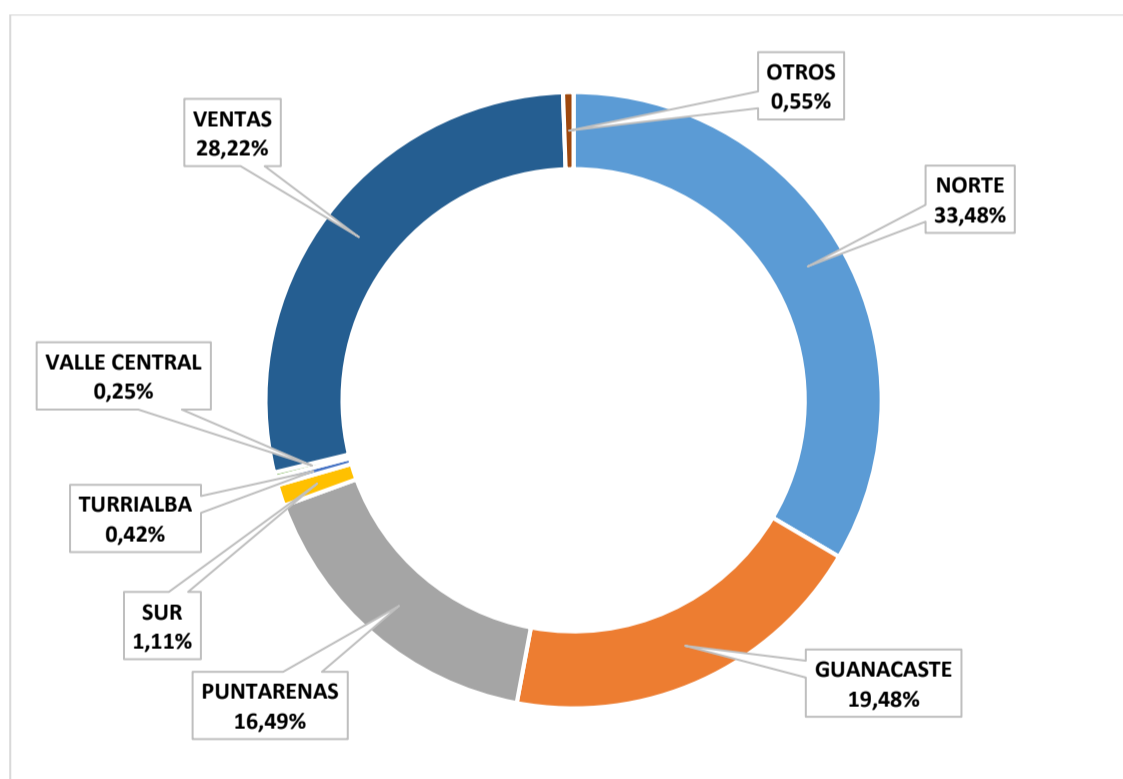


FIGURA 6.
Cobertura histórica porcentual con hongos entomopatógenos según región.
Período 1984 – 2019.

De acuerdo al tipo de beneficiario, los registros históricos han evidenciado un mayor uso de los hongos entomopatógenos a nivel de ingenio, en comparación con los productores independientes. Los primeros aprovecharon 289.556,5 kg, lo que correspondió al 49,56% del total aplicado, y sirvió para cubrir un área de 57.911,3 ha; mientras que los segundos aplicaron 126.636,5 kg (21,67%), en un área de 25.327,3 ha (Cuadro 9 y Figura 7).

CUADRO 9.
Cobertura histórica del programa de producción de hongos entomopatógenos
según tipo de beneficiario. Período 1989-2019.

TIPO DE BENEFICIARIO	Hongo + substrato (kg)	AREA (ha)	%
INGENIOS	289.556,5	57.911,3	49,56
PRODUCTORES	126.636,5	25.327,3	21,67
VENTAS	164.891,0	32.978,2	28,22
OTROS	3.207,7	641,5	0,55
TOTAL	584.291,7	116.858,3	100,0

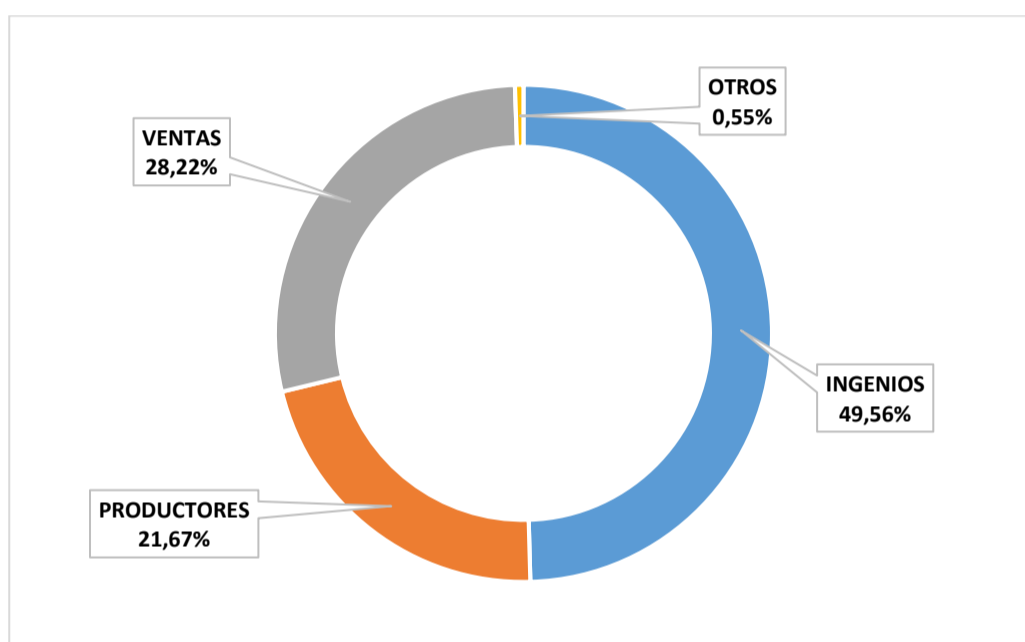


FIGURA 7.
Cobertura histórica porcentual con hongos entomopatógenos según región.
Período 1984 – 2018.



1.4. PRODUCCIÓN ANUAL DEL PARASITOIDE *Cotesia flavipes*.

En el año 2019 se alcanzó una producción total de 35.298.00 avispas, de las cuales 31.537.500 (89,35%), fueron liberadas como agente de control del barrenador común del tallo, *Diatraea guatemalaella*, *D. tabernella* y *D. saccharalis*; las restantes 3.760.500 avispas (10,65%), se utilizaron dentro de la Unidad Reproductora para asegurar la continuidad del proceso de reproducción, lo que se conoce como “pie de cría” (Cuadro 10). La Figura 8 muestra que la distribución mensual de la producción presentó algunos altibajos debido a problemas de producción, principalmente por la presencia del microsporidio *Nosema* sp y de bacterias en larvas parasitadas (presuntamente del género *Serratia* sp) en los meses de enero a marzo, y de levaduras en la dieta de iniciación en el mes de junio.

CUADRO 10.
Producción mensual de *Cotesia flavipes* para el control de *Diatraea* spp y para el mantenimiento del pie de cría. Año 2019.

MES	CAMPO	PIE DE CRÍA	TOTAL	% MENSUAL
ENERO	343.500	564.000	907.500	2,57
FEBRERO	2.617.500	235.500	2.853.000	8,08
MARZO	2.815.500	325.500	3.141.000	8,90
ABRIL	4.896.000	184.500	5.080.500	14,39
MAYO	3.829.500	324.000	4.153.500	11,77
JUNIO	1.963.500	433.500	2.397.000	6,79
JULIO	3.736.500	411.000	4.147.500	11,75
AGOSTO	2.881.500	337.500	3.219.000	9,12
SEPTIEMBRE	2.781.000	261.000	3.042.000	8,62
OCTUBRE	1.930.500	406.500	2.337.000	6,62
NOVIEMBRE	2.668.500	165.000	2.833.500	8,03
DICIEMBRE	1.074.000	112.500	1.186.500	3,36
TOTAL	31.537.500	3.760.500	35.298.000	100
%	89,35	10,65	100	-

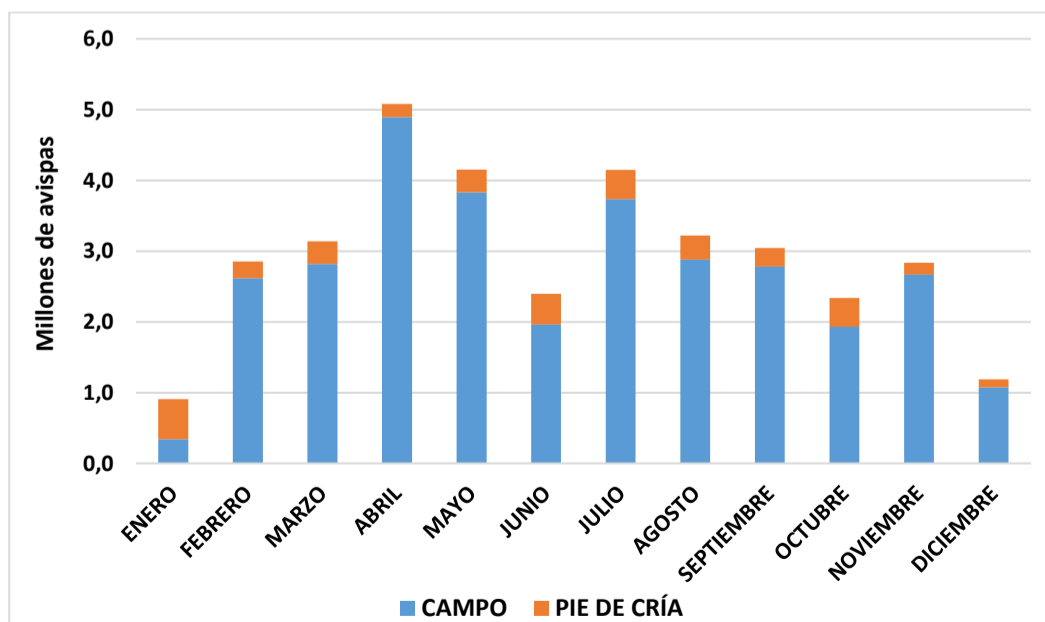


FIGURA 8.
Producción mensual de avispas durante el año 2019.

1.5. COBERTURA ANUAL CON EL PARASITOIDE *Cotesia flavipes*.

De acuerdo al Cuadro 11, el principal usuario del programa durante el año 2019, fue Hacienda Juan Viñas, en donde se liberó un total de 4.984.500 avispas, con una cobertura de 830,8 ha, lo cual representó el 15,80% del total liberado. En segundo lugar se colocó el Ingenio Taboga, donde se liberó un total de 4.233.000 avispas, con una cobertura de 705,5 ha, y representando esto el 13,42% del total. El tercer lugar correspondió a los Productores de la Región Sur, en cuyas fincas se liberó un total de 3.148.500 avispas, con una cobertura de 524,8 ha, y representando esto el 10,98% del total liberado.

Ocupando posiciones intermedias se ubicaron los productores de la Región Norte, con una liberación de 2.610.000 avispas, y un área de cobertura de 435,0 ha, lo que representó el 8,28% del total; los Productores en el Valle Central, con una liberación de 2.088.000 de avispas, y una cobertura de 348,0 ha, y representando esto el 6,62%; fincas del Ingenio Quebrada Azul, con una liberación de 1.981.500 avispas, en 330,3 ha, y representando esto el 6,28%; fincas del Ingenio CoopeAgri, con una liberación de 1.503.000 avispas, una cobertura de 250,5 ha, y representando esto el 4,77%.

Finalmente con menores cantidades liberadas se ubicaron fincas del Ingenio CoopeVictoria, con una liberación de 922.500 avispas, una cobertura de 153,8 ha, representando el 2,93% del total; fincas del Ingenio Cutris con una liberación de 628.500 avispas en un área de 104,8 ha, representando el 1,99%; y los productores en Guanacaste con una liberación de 508.500 avispas, en un área de 84,8 ha y representando el 1,61%.

CUADRO 11.
Cobertura del programa de producción de *Cotesia flavipes* durante el año 2019.

BENEFICIARIO	AVISPAS	COBERTURA (ha)	%
Ingenio Juan Viñas	4.984.500	830,8	15,80
Ingenio Taboga	4.233.000	705,5	13,42
Productores región Sur	3.148.500	524,8	10,98
Productores región Norte	2.610.000	435,0	8,28
Productores Valle Central	2.088.000	348,0	6,62
Ingenio Quebrada Azul	1.981.500	330,3	6,28
Ingenio CoopeAgri	1.503.000	250,5	4,77
Ingenio CoopeVictoria	922.500	153,8	2,93
Ingenio Cutris	628.500	104,8	1,99
Productores Guanacaste	508.500	84,8	1,61
Investigación	28.500	4,8	0,09
Ventas	8.901.000	1.483,5	28,22
TOTAL	31.537.500	5.256	100

Regionalmente, de acuerdo al tipo de beneficiario (productores independientes, ingenios), el Cuadro 12 muestra que en la región de Turrialba, la totalidad de las avispas (4.984.500) se liberaron en fincas de la Hacienda Juan Viñas. En la región Norte, los productores independientes y las fincas de los ingenios de la zona, liberaron igual cantidad de avispas, un total de 2.610.000. En la región Sur los productores liberaron 3.148.500 avispas, correspondiendo esto al 67,7% del total regional; por su parte, el ingenio CoopeAgri liberó 1.503.000 avispas (32,3%). En la región guanacasteca, los productores liberaron un total de 508.500 avispas, lo que representó el 10,7% del total regional; mientras que los ingenios de la zona, liberaron 4.233.000 avispas, lo que representó el restante 89,3%. Finalmente, en la región del Valle Central, los productores liberaron 2.088.000 avispas, correspondiendo esto al 69,4%; mientras que los ingenios de la zona liberaron 922.500 avispas, lo que representó el 30,6% del total regional.

CUADRO 12.
Cobertura del programa de producción de *Cotesia flavipes* según región y tipo de beneficiario durante el año 2019.

REGIÓN	TIPO DE BENEFICIARIO	AVISPAS	COBERTURA (ha)	% REGIONAL
Turrialba	Ingenios	4.984.500	831	100
	Productores	0	0	0
Norte	Ingenios	2.610.000	435	50
	Productores	2.610.000	435	50
Sur	Ingenios	1.503.000	251	32,3
	Productores	3.148.500	525	67,7
Guanacaste	Ingenios	4.233.000	706	89,3
	Productores	508.500	85	10,7
Valle Central	Ingenios	922.500	154	30,6
	Productores	2.088.000	348	69,4
Invest., donación, demos.	-	28.500	5	-
Ventas	-	8.901.000	1.484	-
TOTAL	-	31.537.500	5.256	-

De acuerdo al tipo de beneficiario, los ingenios utilizaron un total de 14.253.000 avispas en un área aproximada a las 2.375,5 ha, lo cual representó el 45,19% del total liberado durante el año 2019. Por su parte, los Productores independientes utilizaron 8.355.000 avispas en 1.392,5 ha, lo que representó el 26,49% del total. Las ventas como se indicó anteriormente, fueron de 8.901.000 avispas, lo que representó el 28,22% del total. Finalmente, el total de avispas utilizadas para otros usos (investigación, donaciones y demostraciones de método), fue de 28.500, lo que representó el 0,09% del total producido. El Cuadro 13 y la Figura 9 muestran las cantidades de avispas liberadas en términos absolutos y porcentuales.

CUADRO 13.
Cobertura del programa de producción de *Cotesia flavipes*
según tipo de beneficiario durante el año 2019.

REGIÓN	AVISPAS	COBERTURA (ha)	% REGIONAL
Ingenios	14.253.000	2.375,5	45,19
Productores	8.355.000	1.392,5	26,49
Invest., donación, demos.	28.500	4,8	0,09
Ventas	8.901.000	1.483,5	28,22
TOTAL	31.537.500	5.256,3	100

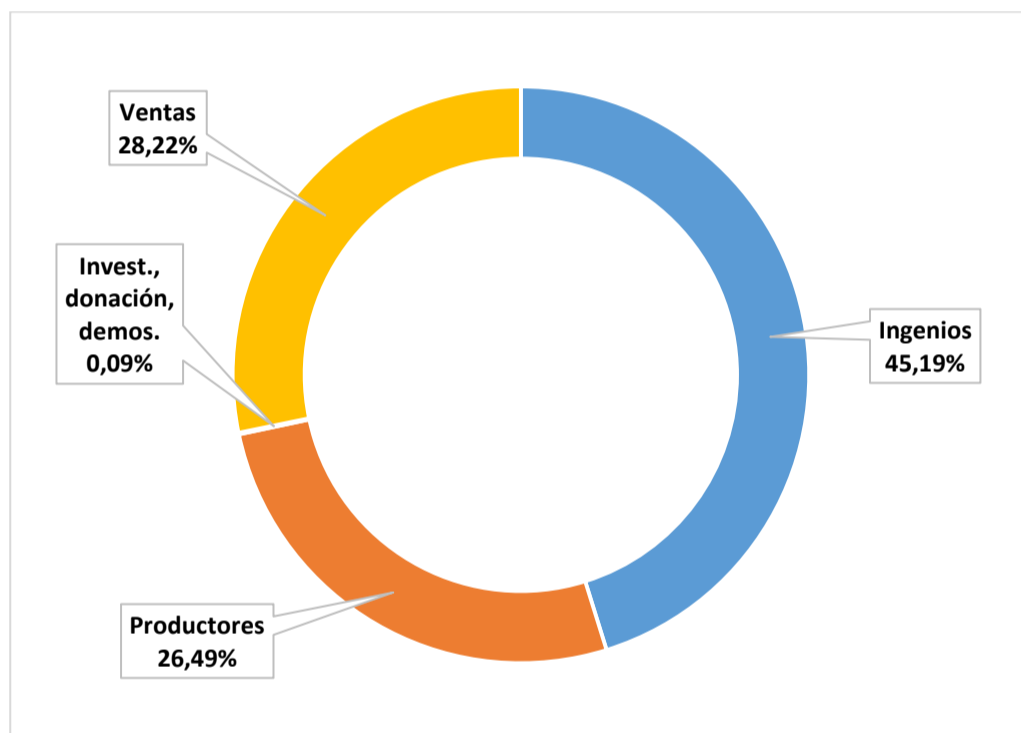


FIGURA 9.
Liberación porcentual de *Cotesia flavipes* según tipo de beneficiario. Año 2019.

A nivel regional, fue en el Norte donde se liberó la mayor cantidad de avispas, con un total de 5.220.000, para una cobertura de 870,0 ha, lo cual representó el 16,55% del total liberado durante el año 2019. En segundo lugar se ubicó la región de Turrialba, liberando 4.984.500 avispas en 830,8 ha; lo que representó el 15,80% del total. En tercer lugar, se ubicó la región de Guanacaste, en donde se liberó un total de 4.741.500 avispas, en un área de 790,3 ha, lo que representó el 15,03% del total. La región Sur y el Valle Central utilizaron un total de 4.651.500 y 3.010.500 avispas, en 775,3 y 501,8 ha, representando esto el 14,75 y 9,55% respectivamente. El Cuadro 14 y la Figura 10 muestran los resultados señalados.

CUADRO 14.
Cobertura del programa de producción de *Cotesia flavipes*
según región durante el año 2019.

REGIÓN	AVISPAS	COBERTURA (ha)	% REGIONAL
Norte	5.220.000	870,0	16,55
Turrialba	4.984.500	830,8	15,80
Guanacaste	4.741.500	790,3	15,03
Sur	4.651.500	775,3	14,75
Valle Central	3.010.500	501,8	9,55
Invest., donación, demostraciones	28.500	4,8	0,09
Ventas	8.901.000	1.483,5	28,22
TOTAL	31.537.500	5.256,3	100

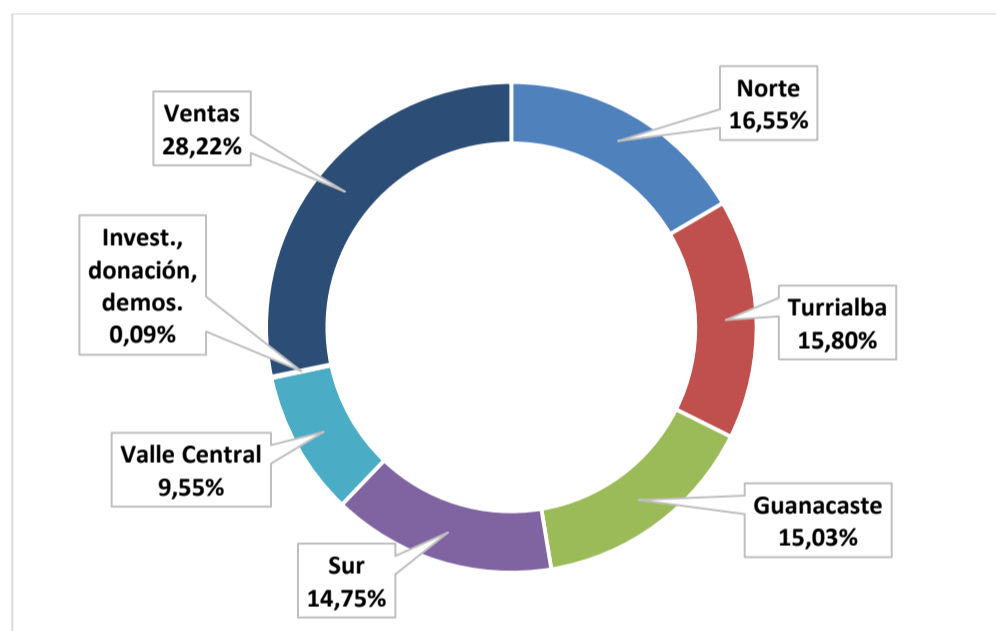


FIGURA 10.
Liberación porcentual de *Cotesia flavipes* según tipo de beneficiario. Año 2019.

1.6. COBERTURA HISTÓRICA DEL PROGRAMA DE PRODUCCIÓN DEL PARASITOIDE *Cotesia flavipes*. PERÍODO 1984-2019.

Con los resultados del año 2019, para el período 1984-2019 (35 años), el Programa de Producción de *Cotesia flavipes*, ha liberado un total de 908.292.997 avispas, en un área aproximada a las 151.382,2 ha.

Los dos principales destinos de las avispas han sido el Ingenio Juan Viñas, en donde se ha liberado la 311.477.500 avispas, en 51.912,9 ha, lo que representa el 34,29% del total liberado; y las ventas (exportación y venta nacional), destinándose para este rubro un total de 238.238.747 avispas, lo cual representa el 26,23% del total.

Con cantidades significativamente menores a los destinos mencionados, se ubican el Ingenio CoopeVictoria donde se liberó 87.026.250 de avispas en 14.504,4 ha, lo que significó el 9,58% del total liberado durante el período; los Productores del Valle Central con 61.840.750 avispas liberadas en 10.306,8 ha (6,81%); los Productores de la Región Norte con 42.102.000 avispas en 7.017,0 ha (4,64%); el Ingenio Taboga con 34.718.000 avispas en 5.786,3 ha (3,82%); el Ingenio Quebrada Azul con 26.893.500 avispas en 4.482,3 ha (2,96%); los Productores en la Región Sur con 27.239.000 avispas en 4.539,1 ha (2,99%); el Ingenio Cutris con 19.412.000 avispas en 3.235,3 ha (2,14%) y el Ingenio CoopeAgri con 19.136.000 avispas en 3.189,3 ha (2,0%). Estos y otros beneficiarios menores del Programa se muestran en el Cuadro 15.

CUADRO 15.
Liberación histórica de *Cotesia flavipes* según beneficiario y región. Período 1984-2019.

BENEFICIARIO	REGIÓN	TOTAL	ÁREA (has)	%
Ingenio Juan Viñas	Turrialba	311.477.500	51.912,9	34,293
Ventas	Varios	238.238.747	39.706,5	26,229
Ingenio Coopevictoria	Valle Central	87.026.250	14.504,4	9,581
Productores Valle Central	Valle Central	61.840.750	10.306,8	6,808
Productores Zona Norte	Norte	42.102.000	7.017,0	4,635
Ingenio Taboga	Guanacaste	34.718.000	5.786,3	3,822
Ingenio Quebrada Azul	Norte	26.893.500	4.482,3	2,961
Productores Región Sur	Sur	27.239.000	4.539,8	2,999
Ingenio Cutris	Norte	19.412.000	3.235,3	2,137
Ingenio CoopeAgri	Sur	19.136.000	3.189,3	2,107
Productores Guanacaste	Guanacaste	13.750.000	2.291,7	1,514
Ingenio Santa Fé	Norte	8.877.500	1.479,6	0,977
Ingenio El Porvenir	Norte	4.698.000	783,0	0,517
Ingenio La Argentina	Valle Central	3.432.500	572,1	0,378
Ingenio Providencia	Norte	3.177.000	529,5	0,350
Productores Turrialba	Turrialba	1.906.500	317,8	0,210
Ingenio Coopecañera	Pacífico Central	1.210.500	201,8	0,133
Ingenio El Viejo	Guanacaste	846.000	141,0	0,093
Donación y Demostración	Varios	904.250	150,7	0,100
Productores Puntarenas	Pacífico Central	666.000	111,0	0,073
Ingenio Costa Rica	Valle Central	268.500	44,8	0,030
Ingenio CATSA	Guanacaste	213.000	35,5	0,023
Ingenio El Palmar	Pacífico Central	120.000	20,0	0,013
Ingenio San Rafael	Norte	72.000	12,0	0,008
Ingenio Atirro	Turrialba	45.000	7,5	0,005
Guápiles	Atlántico	22.500	3,8	0,002
TOTAL		908.292.997	151.382,2	100

A nivel de tipo de beneficiario y su representatividad regional, los registros históricos desde el año 1984 indican que en la región de Turrialba, los productores liberaron un total de 1.906.500 avispas y los ingenios, 311.522.500 avispas, lo que representa el 0,61 y 99,39% a nivel regional.

En el Valle Central los productores liberaron 61.840.750 avispas (40,53%) y a nivel de ingenios, 90.727.250 (59,47%). En la región Norte los productores liberaron 42.102.000 (40,01%) y los ingenios 63.130.000 (59,99%). En la región de Guanacaste los productores liberaron 13.750.000 avispas (27,76%), mientras que en fincas de ingenios se liberó 35.777.000 (72,24%). En la región Sur del país, los productores liberaron 27.239.000 avispas (58,74%) y en el ingenio de la zona se liberó 19.136.000 (41,26%). En la región del Pacífico Central, lo productores liberaron 666.000 avispas (33,36%), mientras que los ingenios liberaron 1.330.500 avispas (66,64%); finalmente, durante el período se liberó un total de 22.500 avispas en la región Atlántica, para atender pequeños brotes del barrenador en la Estación Los Diamantes de Guápiles, donde DIECA mantiene un área para dar cuarentena a los materiales genéticos que provienen del exterior (Cuadro 16).

CUADRO 16.
Liberación histórica de *Cotesia flavipes* según tipo de beneficiario
y su representatividad regional. Período 1984-2019.

REGIÓN	TIPO DE BENEFICIARIO	TOTAL	ÁREA (has)	%
Turrialba	Ingenios	311.522.500	51.920	99,392
	Productores	1.906.500	318	0,608
Valle Central	Ingenios	90.727.250	15.121	59,467
	Productores	61.840.750	10.307	40,533
Norte	Ingenios	63.130.000	10.522	59,991
	Productores	42.102.000	7.017	40,009
Guanacaste	Ingenios	35.777.000	5.963	72,237
	Productores	13.750.000	2.292	27,763
Sur	Ingenios	19.136.000	3.189	41,264
	Productores	27.239.000	4.540	58,736
Pacífico Central	Ingenios	1.330.500	222	66,642
	Productores	666.000	111	33,358
Atlántico Otros	Guanacaste	22.500	4	-
		904.250	151	-
Ventas		238.238.747	39.706	-
TOTAL		908.292.997	151.382,2	-

De acuerdo al tipo de beneficiario y para el período 1984-2018, los ingenios, históricamente han utilizado la mayor cantidad de avispas, un total 507.370.250 para una cobertura de 84.561,7 ha, lo que representa el 57,9% del total liberado; mientras que los productores liberaron 139.149.250 avispas en un área de 23.191,5 ha, lo que representó el 15,9% del total liberado. Las ventas acumularon las 229.337.747 avispas, lo que representó el 26,2% y otros destinos (demostraciones de método, donaciones y liberación en la estación de cuarentena) acumularon 898.250 avispas utilizadas, lo cual representó el 0,1% del total (Cuadro 17 y Figura 11.).

CUADRO 17.
Liberación histórica de *Cotesia flavipes* según tipo de beneficiario. Período 1984-2019.

TIPO DE BENEFICIARIO	TOTAL	ÁREA (has)	%
Ingenios	521.623.250	86.937,2	57,43
Productores	147.504.250	24.584,0	16,24
Ventas	238.238.747	39.706,5	26,23
Otros	926.750	154,5	0,10
TOTAL	908.292.997	151.382,2	100

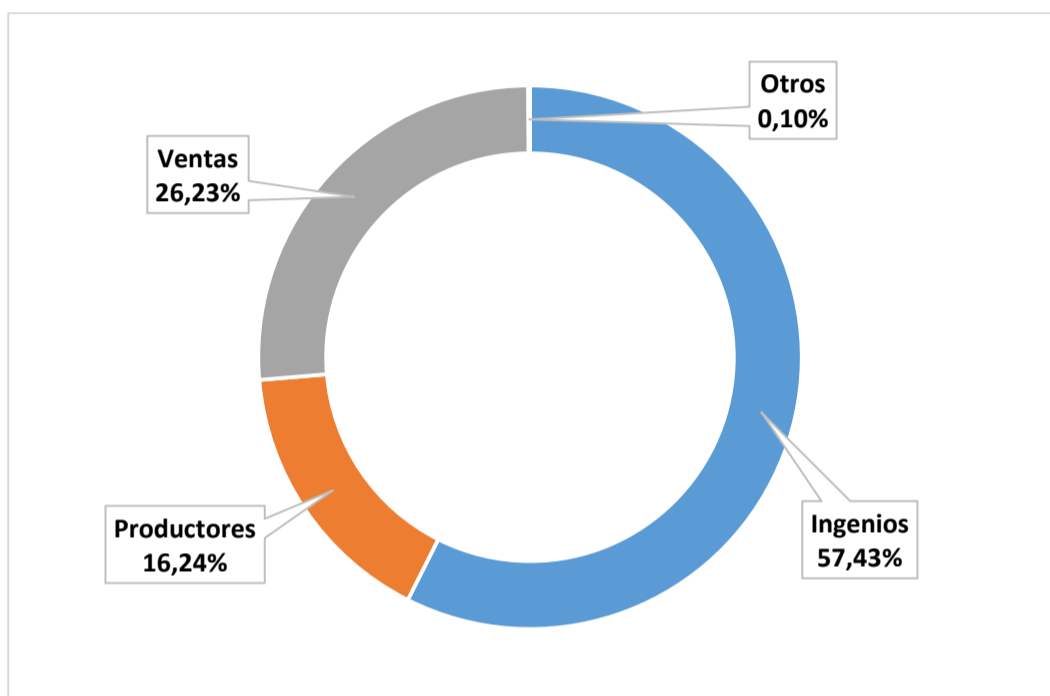


FIGURA 11.
Liberación histórica porcentual de *Cotesia flavipes* según tipo de beneficiario. Período 1984-2019.

A nivel regional, en la zona de Turrialba se liberó 308.444.500 avispas para un área de cobertura de 51.507,7 ha; esto representó el rubro más alto de liberación a nivel nacional con el 35,2% del total. En el Valle Central se liberó un total de 157.432.500 avistas un total de 26.238,8 ha, lo cual representó el 18,0% del total liberado. En la región Norte se liberó un total de 92.137.000 avispas, cubriendo 15.356,2 ha, lo que representó el 10,5%. En la región de Guanacaste se liberó un total de 44.785.500 avispas, para una cobertura total de 7.464,3 ha, lo que representó el 5,1%. En la región Sur se liberó un total de 41.723.500 avispas, para un área de cobertura de 6.953,9 ha, lo que representó el 4,8%. En Puntarenas se liberó un total de 1.996.500 avispas, cubriendo 332,8 ha, lo que representó el 0,2% del total. Como se mencionó, las ventas acumularon las 229.337.747 avispas, lo que representó el 26,2% del total liberado.

Finalmente, otros destinos de las avispas en demostraciones, donaciones y en aplicaciones en la estación de cuarentena en la zona Atlántica, acumularon 898.250 avispas liberadas, lo que representó el 0,1% del total (Cuadro 18 y Figura 12).

CUADRO 18.
Liberación histórica de *Cotesia flavipes* según región. Período 1984-2019.

REGIÓN	TOTAL	ÁREA (has)	%
Turrialba	313.429.000	52.238,2	34,507
Valle Central	152.568.000	25.428,0	16,797
Norte	105.232.000	17.538,7	11,586
Guanacaste	49.527.000	8.254,5	5,453
Sur	46.375.000	7.729,2	5,106
Pacífico Central	1.996.500	332,8	0,220
Atlántica	22.500	3,8	0,002
Otros	904.250	150,7	0,100
Ventas	238.238.747	39.706,5	26,229
TOTAL	908.292.997	151.382,2	100

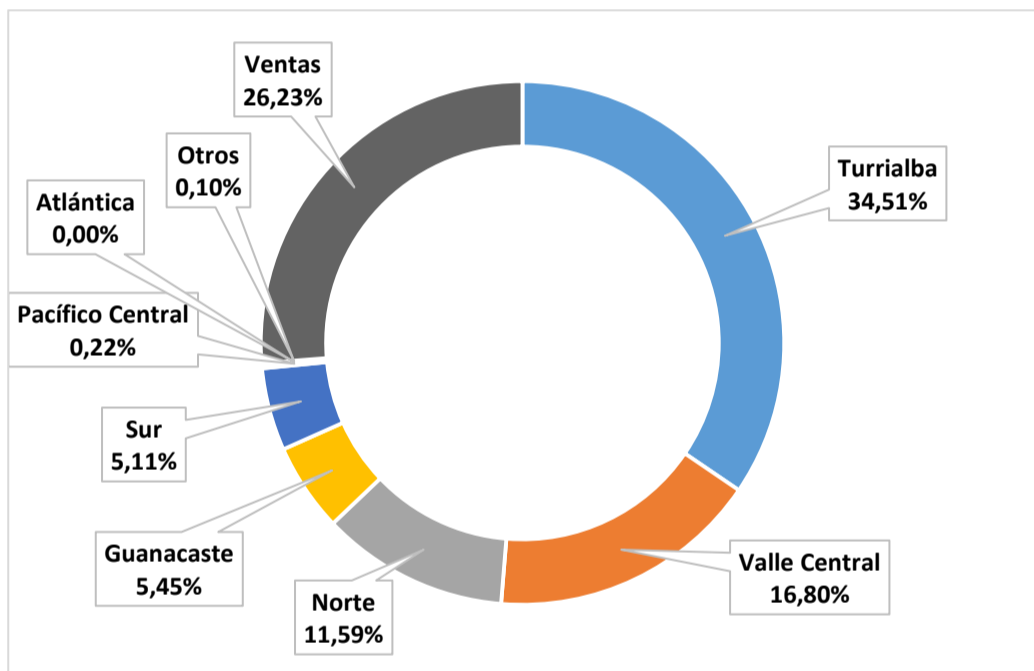


FIGURA 12.
Liberación histórica porcentual de *Cotesia flavipes* según región.
Período 1984-2019.



2. PLANTA DE PRODUCCIÓN DE SUBSTRATOS PARA SIEMBRA EN VIVERO.

Alejandro Rodríguez Morales



2.1. PRODUCCIÓN Y UTILIZACIÓN DE SUSTRATOS DURANTE EL AÑO 2019.

Durante el año 2019 la planta de producción de sustratos para siembra de caña en viveros, produjo un total de 17,61 tm, de las cuales, 6,0 tm (34,1%), fue constituido por la fórmula T4; 5,52 tm (31,4%) por la fórmula tradicional sin contenido de lodo; 4.090 tm (23,2%) por una fórmula optimizada con un contenido máximo de 5% de lodo y 2,0 tm (11,4%) por suelo tratado térmicamente para ser utilizado en investigación a nivel de tesis de grado (Cuadro 19 y Figuras 13 y 14).

CUADRO 19.
Producción de mensual de sustratos de siembra según fórmula. Año 2019.

MES	T4	LODO 5%	TRADICIONAL	SUELO TRATADO	TOTAL / MES
ENERO	0	0	300	0	300
FEBRERO	4.900	0	4.000	0	8.900
MARZO	1.100				1.100
ABRIL	0				0
MAYO	0				0
JUNIO	0				0
JULIO	0				0
AGOSTO		900			900
SETIEMBRE	0	0	0	0	0
OCTUBRE		3.190			3.190
NOVIEMBRE			1.224	2.000	3.224
DICIEMBRE	0	0	0	0	0
TOTAL / FÓRMULA	6.000	4.090	5.524	2.000	17.614
% FÓRMULA	34,1	23,2	31,4	11,4	100
TOTAL	17.614				-

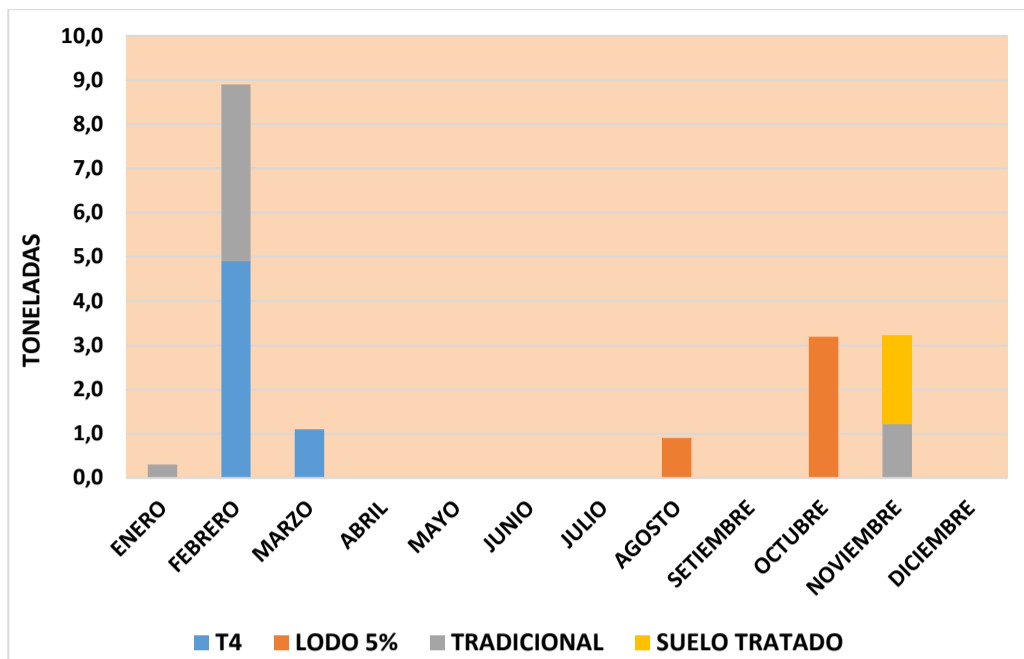


FIGURA 13.
Distribución mensual de la producción de sustratos para siembra según fórmula. Año 2019.

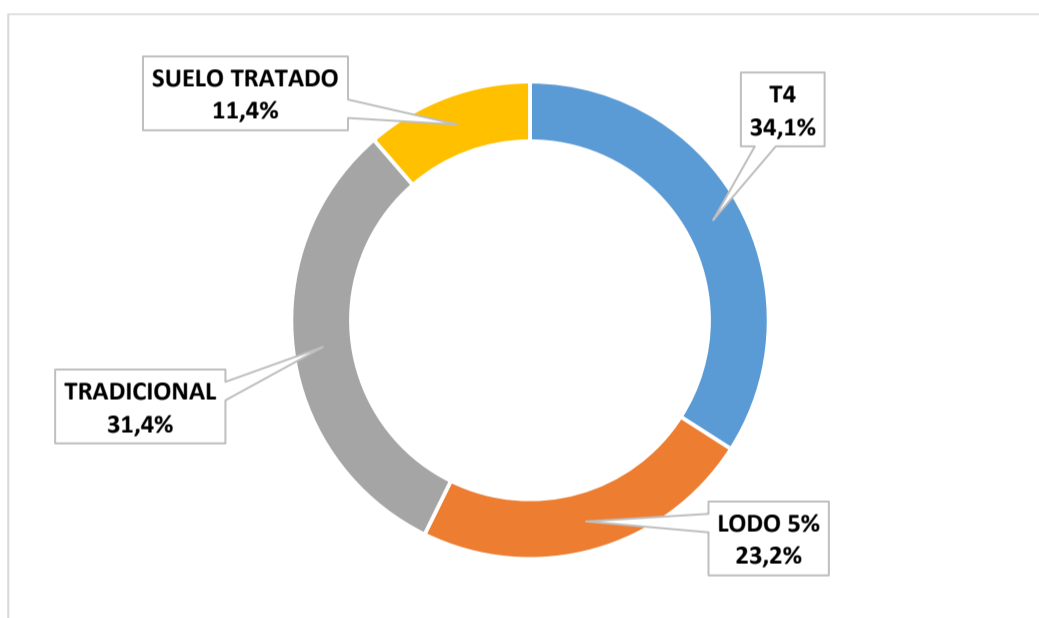


FIGURA 14.
Producción porcentual de sustratos para siembra según fórmula. Año 2019.

2.2. REGISTROS DE UTILIZACIÓN DE SUSTRATOS. PERÍODO 2017-2019.

De acuerdo a los registros de utilización de los sustratos, durante el año 2019, el principal usuario fue el Programa de Variedades con 7,73 tm, correspondiendo esto al 66,75% del total producido. El programa de semilleros utilizó 3,50 tm con lo cual se ubicó en el segundo lugar representando el 30,22% del total. En tercer lugar se ubicó el uso de sustratos para la realización de investigaciones a nivel de vivero, las cuales se enfocaron principalmente en la evaluación de microorganismos nativos como agentes de control del joboto, *Phyllophaga* spp. Estos proyectos requirieron 0,1 tm, lo que representó el 0,86% del total. Se registró finalmente la donación de 0,25 tm (2,16) de sustratos para ser evaluados por la empresa Orgánicos Ecogreen. Estos datos se muestran en el Cuadro 20 y la Figura 15.

CUADRO 20.
Utilización de sustratos para siembra según destino. Año 2019.

DESTINO	CANTIDAD (tm)	%
Programa Variedades	7,73	66,75
Programa Semilleros	3,50	30,22
Investigación	0,10	0,86
Donación	0,25	2,16
TOTAL	11,58	100

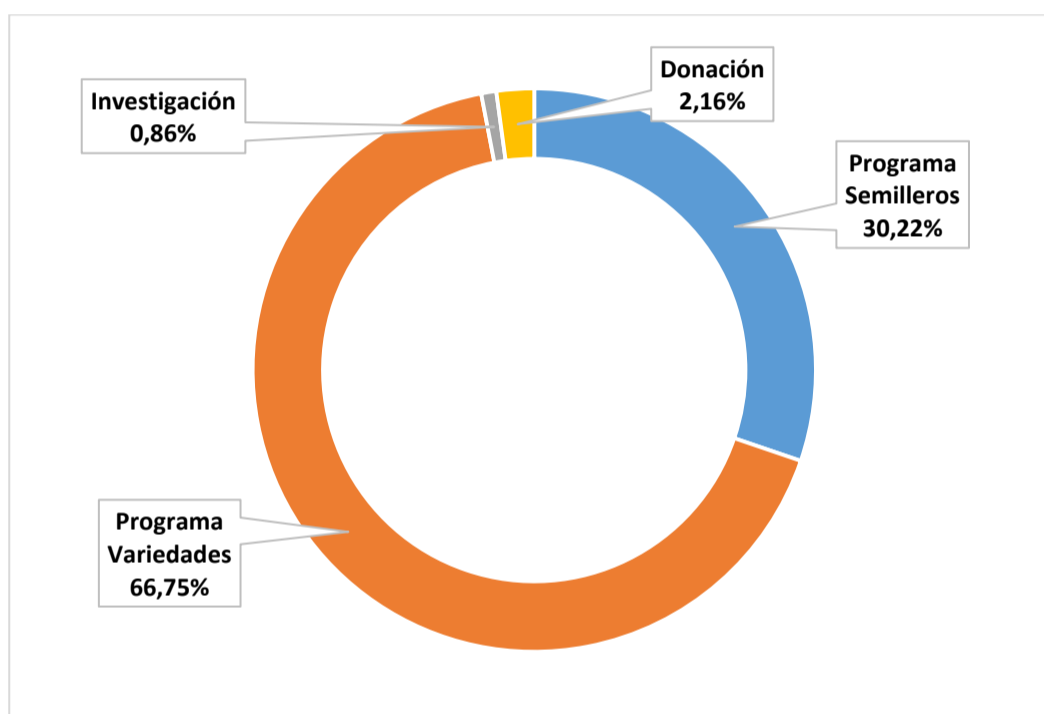


FIGURA 15.
Utilización porcentual de sustratos para siembra según destino. Año 2019.

Con estos resultados, para el período 2017-2019, se ha utilizado un total de 49,08 tm de diferentes fórmulas de sustratos para siembra. De este total, el Programa de Semilleros ha aprovechado la mayor cantidad con 14,90 tm, representando esto el 30,36%; el Programa de Variedades ha utilizado un total de 14,53 tm, para una representatividad del 29,60%; por su parte las ventas, acumularon durante el período un total de 11,70 tm, lo que representó el 23,84%; para labores de investigación y desarrollo de nuevas fórmulas de sustratos y la evaluación de agentes biológicos a nivel de vivero, se ha utilizado 7,70 tm, lo que representó el 15,69%; y finalmente, se ha donado 0,25 tm como muestras a posibles clientes interesado en la adquisición de este material (Cuadro 21).

CUADRO 20.
Producción de mensual de sustratos de siembra según destino y fórmula.
Período 2017-2019.

CLIENTE	AÑO			TOTAL/CLIENTE	%
	2017	2018	2019		
Programa Semilleros	6,8	4,6	3,5	14,90	30,36
Programa Variedades	1,1	5,7	7,73	14,53	29,60
Investigación	6	1,6	0,1	7,70	15,69
Ventas	9,2	2,5	0	11,70	23,84
Donación	0	0	0,25	0,25	0,51
TOTAL	23,1	14,4	11,58	49,08	100

3. PROPUESTAS TÉCNICAS PARA LA ASIGNACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO Y SUSTRATOS PARA SIEMBRA.

Alejandro Rodríguez Morales, José Daniel Salazar Blanco

Anualmente se presenta para la consideración de los señores miembros de la Junta Directiva de LAICA, una propuesta para la asignación y distribución de los agentes de control biológico basada en la utilización histórica y reciente de estos insumos. Con base en estos registros y considerando además tendencias particulares en cada región respecto al nivel esperado de ataque de las diferentes plagas insectiles, se genera y recomienda la llamada Propuesta Técnica para la Asignación y Distribución de Controladores Biológicos.

Se informa además de en este apartado, las expectativas de producción de sustratos para atender la demanda interna de los programas de semilla básica, Variedades y para la realización de diferentes investigaciones.

3.1. Metodología utilizada.

Para la confección de las Propuestas de Asignación y Distribución se utilizaron tres tipos de registros:

- a) **Promedio Anual Histórico** de Asignación según beneficiario y región para el período 1984-2019 (36 años), para el caso del parasitoide *Cotesia Flavipes*, y para el período 1989-2019 (31 años), para el caso de los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*.
- b) **Promedio Anual** de Asignación según beneficiario y región para el último trienio (2017-2019).

c) Asignación según beneficiario y región del **último año (2019)**.

Con base en la información recabada en los puntos a, b y c, se calcularon los porcentajes de asignación respectivos según ingenio, productores, tipo de beneficiario, región cañera y otros destinos (investigación, donación y demostración de método), y estos porcentajes se aplicaron al total de Controladores Biológicos presupuestado para el presente año, que para el caso del parasitoide *Cotesia flavipes* será de 50,0 millones de avispas (32,0 millones con presupuesto ordinario y 18,0 millones con presupuesto extraordinario) y de 24,0 t hongos entomopatógenos sobre sustrato de arroz. De esta forma se calculó cuál sería la asignación de cada tipo de controlador según parámetro utilizado (promedio histórico, trianual y último año).

Finalmente, utilizando un criterio estrictamente técnico en el cual se consideró los pronósticos de incidencia, severidad y distribución de plagas, se generó la Propuesta Técnica que es la que finalmente fue recomendada como guía para la asignación de los controladores biológicos.

3.2. Caso de Hongos Entomopatógenos

El Cuadro 21 muestra en detalle las cantidades de hongos entomopatógenos a aplicar en ingenios según propuesta. Si la propuesta se basara en los porcentajes históricos de 31 años de aplicaciones, en conjunto les correspondería un total de 16.770,4 kg; si se basara en el promedio los últimos 3 años, les correspondería 18.126,4 kg, y si se basara en los porcentajes de aplicación del año pasado, les correspondería 18.755,6 kg. La propuesta técnica fijó en 17.500,0 kg el material disponible para distribuir entre los ingenios. Las diferencias se explican, tal como se mencionó anteriormente, en una mayor utilización en ingenios frente a productores durante los últimos años, sobre todo en el ingenio El Palmar y en el ingenio Cutris, como resultado de fuertes ataques del salivazo. Esta situación fue aún más marcada en el ingenio El Palmar durante los años 2018 y 2019.

La propuesta técnica busca mantener los niveles de aplicación de hongos elevados entre los clientes más tradicionales de los últimos años como El Palmar (5.000,0 kg), Cutris (4.000,0 kg) y Taboga (2.500,0 kg), pero a la vez, facilitar material a otros ingenios que han venido reportando incrementos importantes en plagas, como es el caso del ingenio Juan Viñas por efecto del gusano cogollero (*Spodoptera* sp), CoopeVictoria (áfidos) y CoopeAgri (cigarrita antillana). La Figura 16 muestra porcentualmente las cantidades según la propuesta técnica.

CUADRO 21.
Propuestas para la asignación y distribución de hongos entomopatógenos a ingenios durante el año 2020.

INGENIOS	FUNDAMENTO				RESPECTO CRITERIO TÉCNICO (%)
	PROM. 1989-2019 (kg)	PROM. 2017-2019 (kg)	AÑO 2019 (kg)	CRITERIO TÉCNICO (kg)	
El Palmar	4.835,8	8.251,6	8.200,9	5.000,0	28,6
Cutris	3.140,5	5.205,7	4.947,6	4.000,0	22,9
Taboga	2.254,6	2.441,4	2.884,1	2.500,0	14,3
Q. Azul	1.580,2	1.067,3	1.236,5	3.500,0	20,0
Juan Viñas	138,2	232,5	0,0	250,0	1,4
CoopeVictoria	347,2	657,5	1.266,7	1.500,0	8,6
CoopeAgri	292,2	22,9	55,0	250,0	1,4
CATSA	672,0	148,7	146,5	250,0	1,4
El Viejo	1.282,5	18,7	18,3	250,0	1,4
Otros	2.227,1	80,0	0,0	0,0	0,0
TOTAL	16.770,4	18.126,4	18.755,6	17.500,0	100

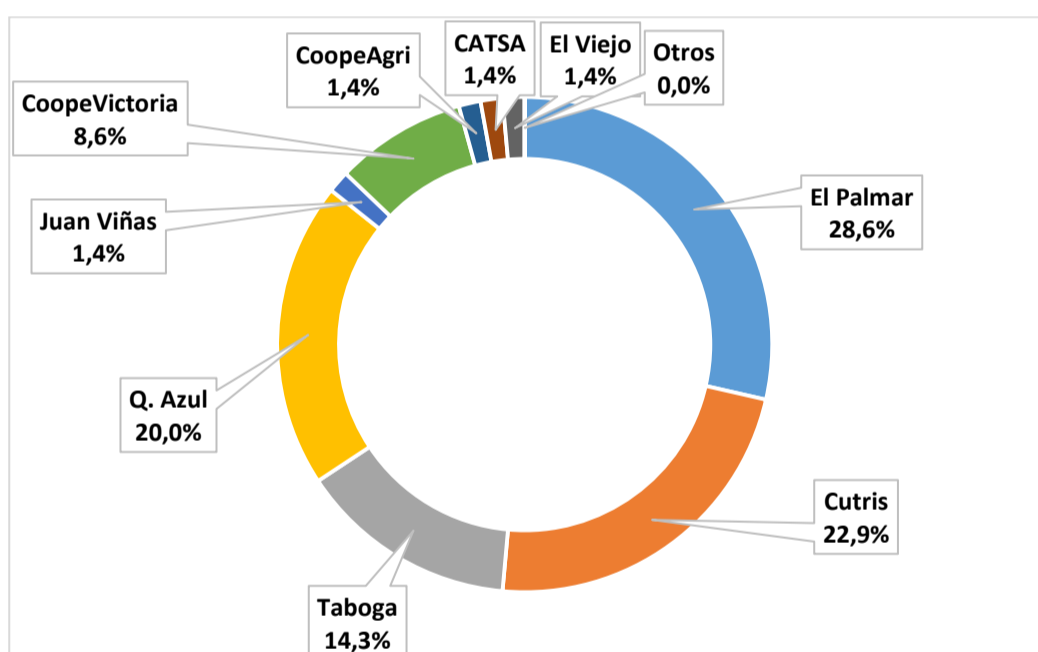


FIGURA 16.
Asignación porcentual de hongos entomopatógenos a ingenios durante el año 2020 según Propuesta Técnica.

A nivel de productores, las diferentes propuestas consideran la asignación de 7.060,9 kg (histórico), 5.618,0 kg (trienio) y 4.950,0 kg (año 2019), donde la región Norte domina en cuanto a la cantidad asignada, con 4.142,1 kg, 3.842,1 kg y 4.284,5 kg, respectivamente. En segundo lugar se ubica la región de Guanacaste con 2.376,7 kg, 1.547,2 kg y 377,3 kg. La propuesta técnica fijó en 4.500,0 kg y 1.000,0 kg, la disponibilidad de hongos para los productores de la región Norte y la región de Guanacaste, respectivamente; en 250,0 kg la disponibilidad para productores en la región Sur y Puntarenas; y finalmente, en 200,0 kg y 100,0 kg para los productores en las regiones del Valle Central y Turrialba (Cuadro 22). La Figura 17 muestra porcentualmente la distribución a nivel de productores.

CUADRO 22.
Propuestas para la asignación y distribución de hongos entomopatógenos a productores durante el año 2020.

PRODUCTORES	FUNDAMENTO				RESPECTO CRITERIO TÉCNICO (%)
	PROM. 1989-2019 (kg)	PROM. 2017-2019 (kg)	2019 (kg)	CRITERIO TÉCNICO (kg)	
Norte	4.142,1	3.842,1	4.284,5	4.500,0	71,4
Guanacaste	2.376,7	1.547,2	377,3	1.000,0	15,9
Sur	84,0	160,5	195,1	250,0	4,0
Puntarenas	395,3	16,4	28,4	250,0	4,0
Valle Central	60,0	51,8	65,0	200,0	3,2
Turrialba	2,8	0,0	0,0	100,0	1,6
TOTAL	7.060,9	5.618,0	4.950,4	6.300,0	100

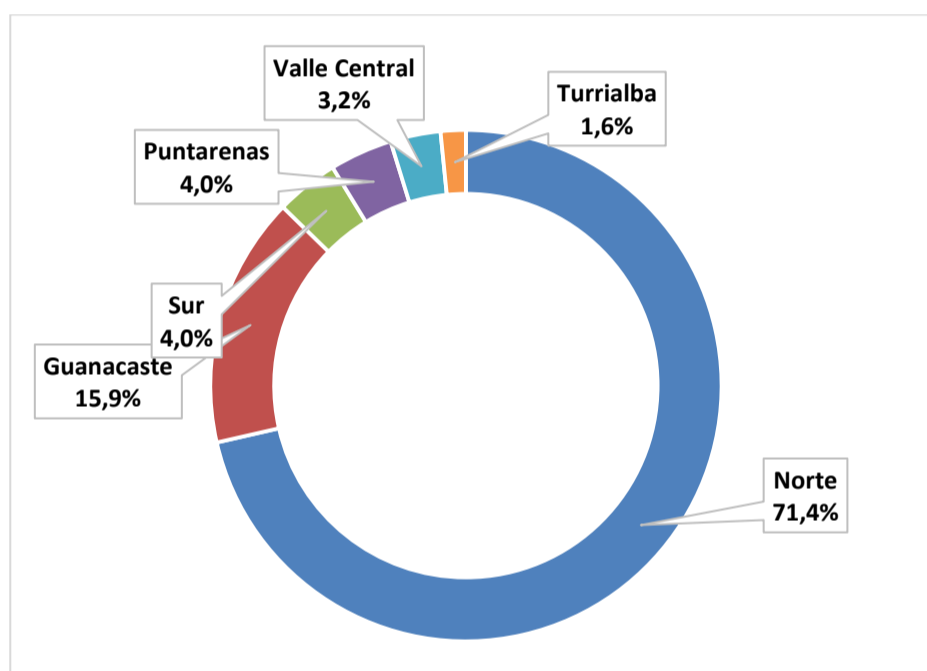


FIGURA 17.
Asignación porcentual de hongos entomopatógenos a productores durante el año 2020 según Propuesta Técnica.

En cuanto a otros usos, las propuestas consideran cantidades muy similares entre sí, dado que este rubro tradicionalmente ha fluctuado entre los 100 y 300 kg por año (Cuadro 23).

CUADRO 23.
Propuestas para la asignación y distribución de hongos entomopatógenos a otros destinos durante el año 2020.

OTROS DESTINOS	FUNDAMENTO				RESPECTO CRITERIO TÉCNICO (%)
	PROM. 1989-2019 (kg)	PROM. 2017-2019 (kg)	2019 (kg)	CRITERIO TÉCNICO (kg)	
Otros	168,7	255,7	294,0	200,0	100,0
TOTAL	168,7	255,7	294,0	200,0	100

De acuerdo al tipo de beneficiario, en todas las propuestas queda reflejado una mayor utilización de los hongos a nivel de ingenio, frente a los productores, situación que como se ha mencionado, viene presentándose en los últimos años motivada por altas demandas en los ingenios El Palmar, Cutris y Taboga, así como en los ingenios Quebrada Azul, CoopeVictoria y CoopeAgri, aunque menor grado. Si bien, la propuesta técnica se basa en estos resultados, busca reducir en cierta medida la brecha entre ingenios y productores independientes, proporcionándoles a éstos últimos, una mayor distribución (6.300,0 kg), en comparación al promedio de los últimos 3 años (5.618,0 kg) y lo utilizado en el año 2019 (4.950,4 kg). El Cuadro 24 muestra detalladamente las cantidades propuestas a liberar según tipo de beneficiario. La Figura 18 muestra gráficamente los porcentajes de hongos entomopatógenos a liberar según tipo de beneficiario. En ese sentido, a los ingenios les correspondería el 72,9%, a los productores el 26,3% y a otros destinos, el 0,8%.

CUADRO 24.
Propuestas para la asignación y distribución de hongos entomopatógenos según tipo de beneficiario durante el año 2020.

TIPO DE BENEFICIARIO	FUNDAMENTO				RESPECTO CRITERIO TÉCNICO (%)
	PROM. 1989-2019 (kg)	PROM. 2017-2019 (kg)	2019 (kg)	CRITERIO TÉCNICO (kg)	
Ingenios	16.770,4	18.126,4	18.755,6	17.500,0	72,9
Productores	7.060,9	5.618,0	4.950,4	6.300,0	26,3
Otros	168,7	255,7	294,0	200,0	0,8
TOTAL	24.000,0	24.000,0	24.000,0	24.000,0	100

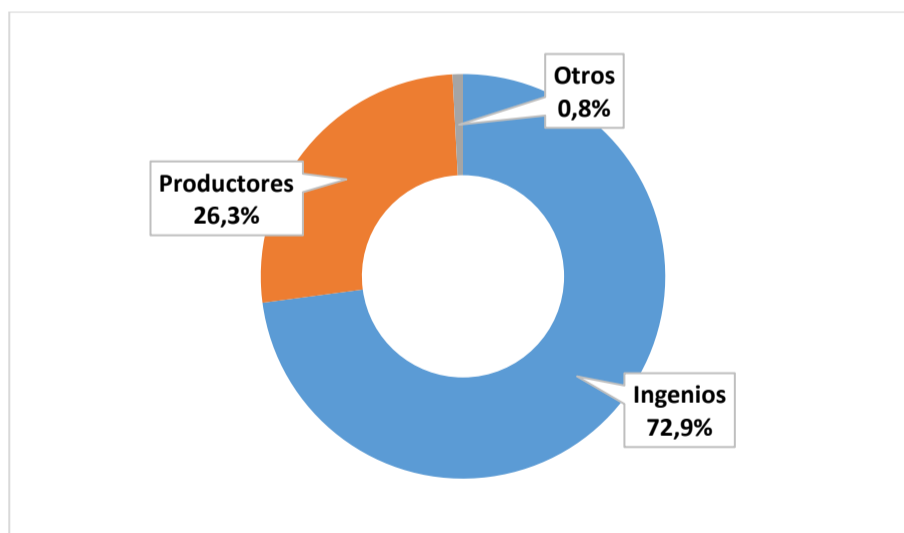


FIGURA 18.
Asignación porcentual de hongos entomopatógenos según tipo de beneficiario durante el año 2020 de acuerdo a la Propuesta Técnica.

De acuerdo a la región cañera (sumatoria de ingenios y productores), indistintamente de la propuesta basada en registros de años anteriores, sería en las regiones Norte, Pacífico Central y Guanacaste, donde se requerirían los volúmenes más elevados de hongos entomopatógenos, principalmente para hacer frente a los brotes recurrentes de salivazo, chinche de encaje y cigarrita antillana. En menor grado estos insumos biológicos serían

requeridos en la región del Valle Central, principalmente para controlar ataque del áfido amarillo; mientras que las regiones Sur y Turrialba requerirían cantidades pequeñas.

La Propuesta Técnica busca mantener las tendencias anteriores, pero balanceando las cantidades aplicadas en Puntarenas, pues se espera que producto de la intensidad del programa aplicado en los años 2018-2019, las poblaciones de salivazo y su daño asociado, sean menores en el año 2020. Esto permitirá incrementar la disponibilidad de hongos en regiones que vienen experimentando brotes de otras plagas como la cigarrita antillana (Sur), el áfido amarillo (Valle Central), e incluso, el cogollero y el picudo negro (*Metamasius hemipterus*) en la región de Juan Viñas y Turrialba. El Cuadro 25 muestra en detalle las cantidades de hongos entomopatógenos según propuesta para cada región cañera, y la Figura 19 muestra porcentualmente las cantidades según la propuesta técnica, mediante la cual la región Norte requeriría el 50,0%, la región de Puntarenas el 21,9%, la región de Guanacaste el 16,7%, la región del Valle Central el 7,1%, la región Sur el 2,1% y la región de Turrialba el 2,1%.

CUADRO 25.
Propuestas para la asignación y distribución de hongos entomopatógenos según región cañera durante el año 2020.

REGIÓN	FUNDAMENTO				RESPECTO CRITERIO TÉCNICO (%)
	PROM. 1989-2019 (kg)	PROM. 2017-2019 (kg)	2019 (kg)	CRITERIO TÉCNICO (kg)	
Norte	10.664,6	10.115,1	10.468,6	12.000,0	50,0
Puntarenas	5.231,1	8.267,9	8.229,3	5.250,0	21,9
Guanacaste	6.585,8	4.156,0	3.426,3	4.000,0	16,7
Sur	376,2	183,3	250,0	500,0	2,1
Turrialba	141,0	232,5	0,0	350,0	1,5
Valle Central	832,5	789,4	1.331,7	1.700,0	7,1
Otros	168,7	255,7	294,0	200,0	0,8
TOTAL	24.000,0	24.000,0	24.000,0	24.000,0	100,0

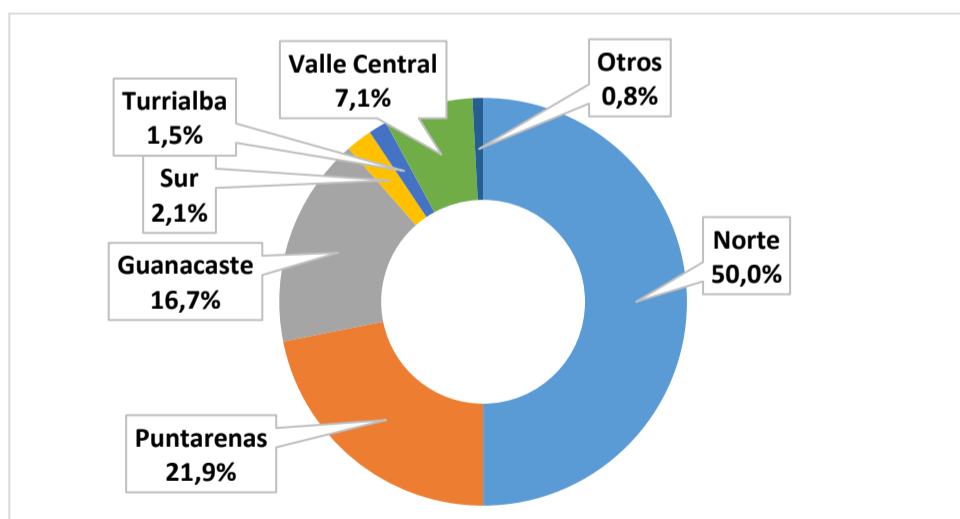


FIGURA 19.
Asignación porcentual de hongos entomopatógenos según tipo de beneficiario durante el año 2020 de acuerdo a la Propuesta Técnica.

3.3. Caso del parasitoide *Cotesia flavipes*.

El Cuadro 26 muestra las cantidades de avispas a liberar de acuerdo a las diferentes propuestas de asignación a nivel de ingenios. Para el caso del promedio histórico la liberación en ingenios sería de 39,18 millones, de acuerdo a lo observado en el último trienio sería de 29,54 millones y de acuerdo al año pasado, sería de 31,28 millones.

Estas fluctuaciones se han presentado principalmente debido a que históricamente la liberación en fincas de la Hacienda Juan Viñas, fueron muy altas en los primeros años del programa, tendiendo luego a decrecer en el último trienio y a incrementarse de nuevo en los dos últimos años. Contribuyen también a estas fluctuaciones, aunque en menor grado, el incremento en las liberaciones de avispas en los Ingenios Taboga y CoopeAgri.

La propuesta técnica busca mantener los niveles de liberación altos en los ingenios que han mostrado mayores problemas con el barrenador común (*Diatraea* spp), como ha sido el caso de la Hacienda Juan Viñas (8,30 millones), CoopeVictoria (5,0 millones), Taboga (8,30 millones), Cutris (2,50 millones) y CoopeAgri (2,90 millones). La Figura 20 muestra porcentualmente las cantidades a asignar según ingenio, para la propuesta técnica.

CUADRO 26.
Propuestas para la asignación y distribución del parasitoide *Cotesia flavipes* según región ingenio durante el año 2020.

INGENIO	FUNDAMENTO				
	PROM. 1984-2019	PROM. 2017-2019	2019	CRITERIO TÉCNICO	%
Juan Viñas	23.670.420	9.583.964	11.130.091	8.300.000	27,04
Coopevictoria	6.649.783	5.263.365	2.059.887	5.000.000	16,29
Taboga	2.354.353	6.366.371	8.906.083	8.300.000	27,04
Quebrada Azul	1.923.951	2.613.004	4.424.571	2.500.000	8,14
Cutris	1.450.648	2.610.055	1.403.403	2.500.000	8,14
CoopeAgri	1.361.795	3.057.352	3.356.109	2.900.000	9,45
Santa Fé	685.608	0	0	0	0,00
El Porvenir	362.826	0	0	0	0,00
La Argentina	265.092	0	0	0	0,00
Providencia	245.359	0	0	0	0,00
Coopecañera	93.487	0	0	0	0,00
El Viejo	65.336	0	0	450.000	1,47
Costa Rica	20.736	0	0	0	0,00
CATSA	16.450	0	0	200.000	0,65
El Palmar	9.268	0	0	450.000	1,47
San Rafael	5.561	47.187	0	100.000	0,33
Atirro	3.475	0	0	0	0,00
TOTAL	39.184.147	29.541.299	31.280.145	30.700.000	100,00

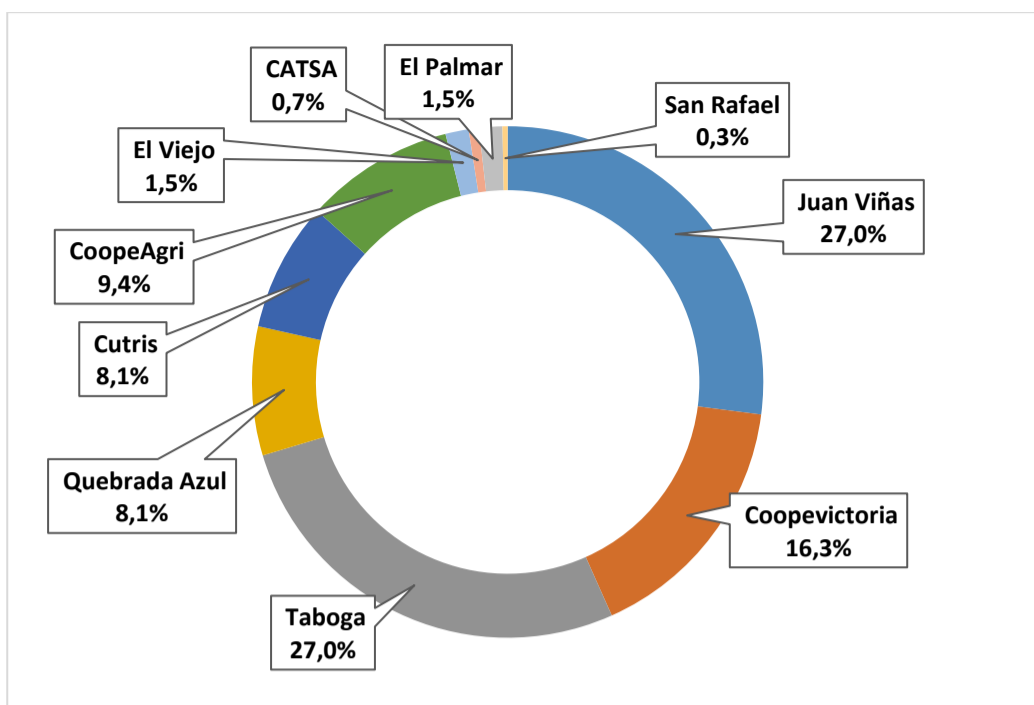


FIGURA 20.
Asignación porcentual del parasitoide *Cotesia flavipes* según ingenio durante el año 2020 de acuerdo a la Propuesta Técnica.

A nivel de productores las propuestas fluctúan entre los 10,75 millones (histórico), los 20,37 millones (trienio) y los 18,66 millones (año 2019). En años recientes, la liberación a productores prácticamente se duplicó por la gran presión de la plaga en fincas de productores situadas en la región Sur, Guanacaste y la región Norte, principalmente. Se espera que esta tendencia al menos en lo que respecta a los productores, se mantenga durante el año 2020, lo cual es una de las razones principales para haber solicitado a la administración de LAICA, recursos adicionales para aumentar en 18 millones respecto a la producción promedio de los últimos años. El Cuadro 27 muestra las cantidades de avispas a liberar según propuesta. Se propone enfatizar las liberaciones en fincas de productores de Guanacaste (5,85 millones) y de la región Sur (5,40 millones). La Figura 21 muestra de manera porcentual, las cantidades de avispas a liberar según productor, para la propuesta técnica.

CUADRO 27.
Propuestas para la asignación y distribución del parasitoide *Cotesia flavipes* según productor durante el año 2020.

PRODUCTORES	FUNDAMENTO				
	PROM. 1984-2019	PROM. 2017-2019	2019	CRITERIO TÉCNICO	%
Valle Central	4.614.698	4.628.301	4.662.379	3.300.000	17,1
Zona Norte	3.049.963	5.556.320	5.827.974	3.750.000	19,4
Región Sur	1.860.507	8.140.815	7.030.413	5.400.000	28,1
Guanacaste	1.022.640	2.032.009	1.135.450	5.850.000	30,4
Turrialba	147.239	9.831	0	850.000	4,4
Puntarenas	51.435	0	0	100.000	0,5
TOTAL	10.748.219	20.367.276	18.656.217	19.250.000	100,00

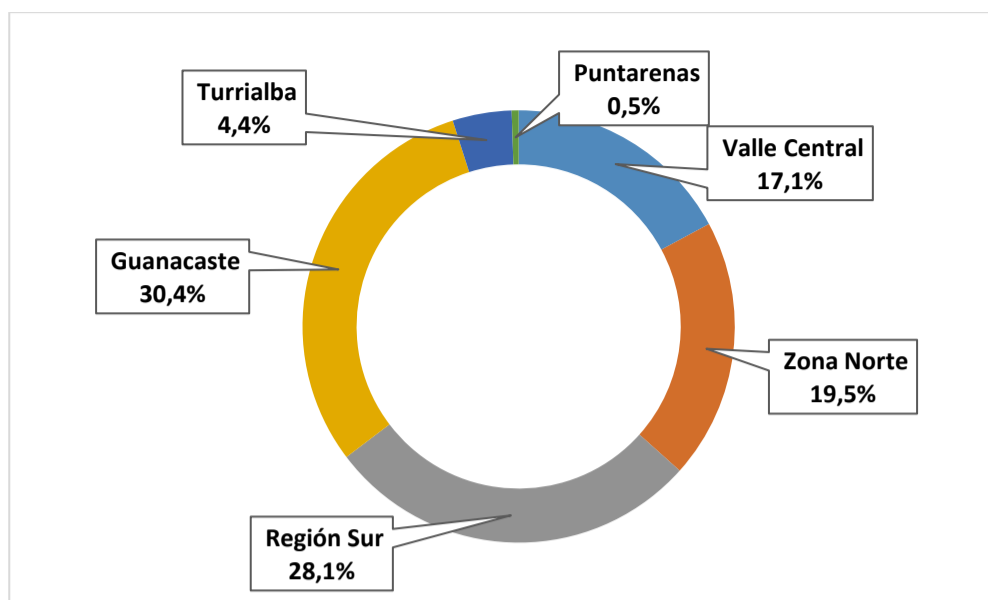


FIGURA 21.
Asignación porcentual del parasitoide *Cotesia flavipes* a productores durante el año 2020 de acuerdo a la Propuesta Técnica.

El Cuadro 28 muestra las cantidades de avispas a liberar a otros destinos (investigación, demostración y donación). Se propone para este ciclo de cultivo, destinar para este rubro, un total de 50.000 avispas.

CUADRO 28.
Propuestas para la asignación y distribución del parasitoide *Cotesia flavipes* a otros destinos durante el año 2020.

OTROS DESTINOS	FUNDAMENTO				
	PROM. 1984-2019	PROM. 2017-2019	2019	CRITERIO TÉCNICO	%
Investigación, donación, demostración	67.634	91.426	63.639	50.000	100,00
TOTAL	67.634	91.426	63.639	50.000	100,00

Con respecto a las propuestas de liberación según tipo de beneficiario, a los ingenios les correspondería 39,18 millones, 29,54 millones y 31,28 millones para los promedios históricos, del último trienio y del último año, respectivamente. A los productores les correspondería en ese mismo orden, 10,75 millones, 20,375 millones y 19,6 millones. Como puede notarse, las cantidades a liberar entre ingenios y productores tendieron a nivelarse en el último trienio, pero se separaron en favor de los primeros en el último año, respondiendo esto a altos niveles de infestación del barrenador en los ingenios Juan Viñas, Taboga, Cutris y CoopeAgri. Se prevé al menos en los ingenios Taboga, CoopeAgri y CoopeVictoria, que esta tendencia se mantenga o incluso, recrudezca durante el 2020, razón por la cual la propuesta técnica refleja en mucho lo acontecido durante el 2018 y 2019. En ese sentido, la propuesta técnica considera liberar 30,70 millones de avispas a nivel de ingenios y 19,25 millones a nivel de ingenios (Cuadro 29). La Figura 22 muestra porcentualmente las cantidades a liberar por región, según la propuesta técnica.

CUADRO 29.
Propuestas para la asignación y distribución del parasitoide *Cotesia flavipes*
según tipo de beneficiario durante el año 2020.

TIPO DE BENEFICIARIO	FUNDAMENTO				
	PROM. 1984-2019	PROM. 2017-2019	2019	CRITERIO TÉCNICO	%
Ingenios	39.184.147	29.541.299	31.280.145	30.700.000	61,4
Productores	10.748.219	20.367.276	18.656.217	19.250.000	38,5
Otros	67.634	91.426	63.639	50.000	0,1
TOTAL	50.000.000	50.000.000	50.000.000	50.000.000	100

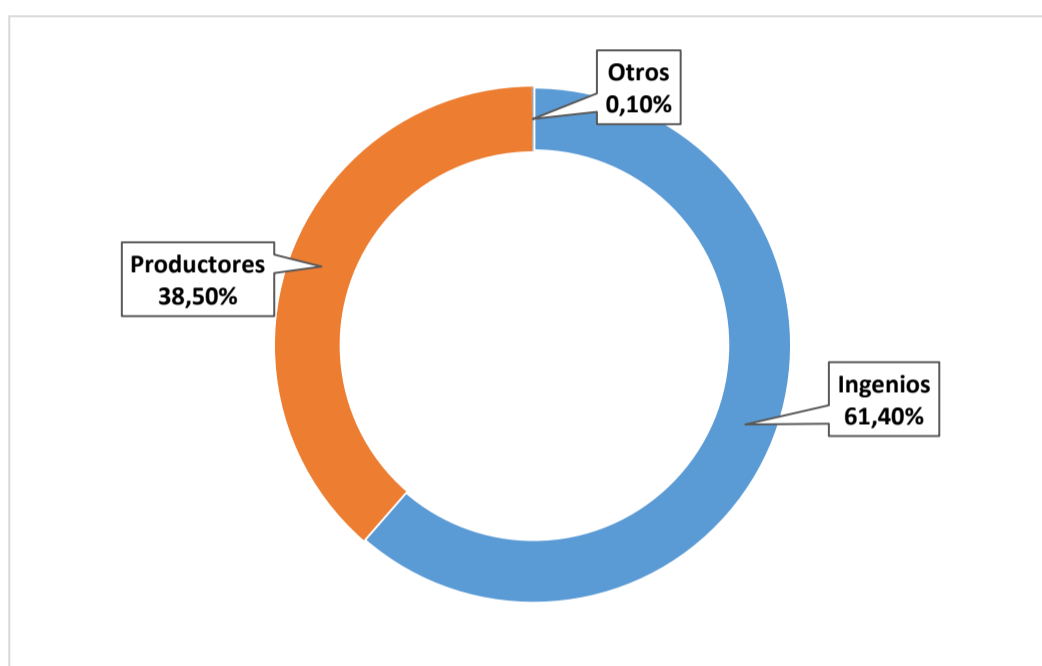


FIGURA 22.
Asignación porcentual del parasitoide *Cotesia flavipes* según tipo de beneficiario
durante el año 2020 de acuerdo a la Propuesta Técnica.

Finalmente, de acuerdo a la región cañera (sumatoria de ingenios y productores de cada zona), la propuesta basada en registros históricos determinaría niveles de aplicación sumamente elevados en la región de Turrialba (23,820 millones), así como niveles relativamente bajos en la región Sur (3,22 millones) y en Guanacaste (3,46 millones), lo cual se contrapone a lo que sería propuesta basada en los registros de liberación del último trienio (9,59 millones, 11,20 millones y 8,40 millones), e incluso, del último año (11,13 millones, 10,39 millones y 10,04 millones, respectivamente).

Regionalmente la liberación propuesta desde el punto de vista técnico, recomienda incrementar a 14,80 millones la liberación de avispas en la región de Guanacaste, fijar en 9,15 millones de avispas la liberación en Juan Viñas, y liberar poco más de 8 millones en las regiones Norte, Guanacaste y el Valle Central (Cuadro 30). La Figura 23 muestra porcentualmente la liberación regional de acuerdo a la propuesta técnica, en donde a la zona Norte le correspondería el 17,7%, a la región Sur y al Valle Central el 16,6%, a Guanacaste el 29,6% y a Turrialba el 18,3%.

CUADRO 30.
Propuestas para la asignación y distribución del parasitoide *Cotesia flavipes*
según región cañera durante el año 2020.

REGIÓN	FUNDAMENTO				
	PROM. 1984-2019	PROM. 2017-2019	2019	CRITERIO TÉCNICO	%
Zona Norte	7.723.916	10.826.567	11.655.949	8.850.000	17,70
Zona Sur	3.222.301	11.198.168	10.386.522	8.300.000	16,60
Guanacaste	3.458.779	8.398.380	10.041.533	14.800.000	29,60
Valle Central	11.550.309	9.891.666	6.722.267	8.300.000	16,60
Turrialba	23.821.134	9.593.795	11.130.091	9.150.000	18,30
Puntarenas	154.189	0	0	550.000	1,10
Otros	69.372	91.426	63.639	50.000	0,10
TOTAL	50.000.000	50.000.000	50.000.000	50.000.000	100,00

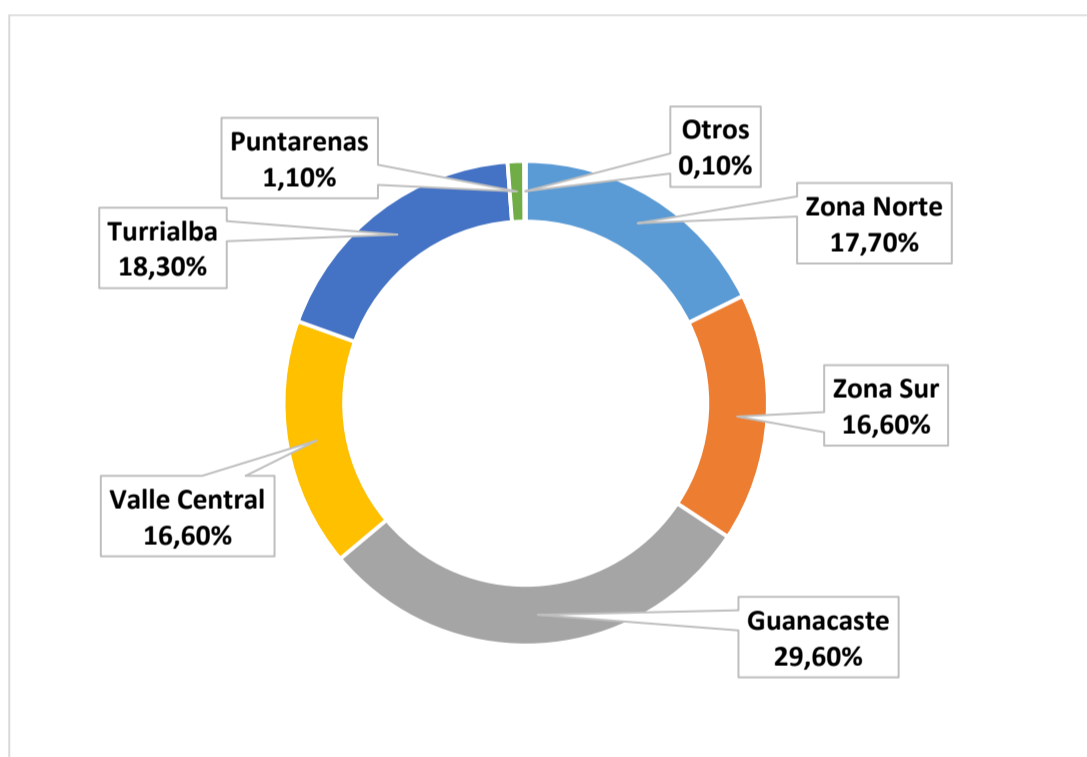


FIGURA 23.
Asignación porcentual del parasitoide *Cotesia flavipes* según región cañera
durante el año 2020 de acuerdo a la Propuesta Técnica.

Finalmente, se solicitó producir un total de 17,0 t de sustratos para atender las necesidades del Programa Nacional de Variedades con 12,0 t (70,6%), el Programa Nacional de Semilleros con 2,0 t (11,8%), la realización de diferentes investigaciones en el área de control biológico de insectos y el desarrollo de biofertilizantes con 2,0 t (11,8%) y destinar una tonelada para posibles ventas (5,9%) (Cuadro 31).

CUADRO 31.

Producción de sustratos de siembra según destino para el año 2020.

DESTINO	TONELADAS	%
Variedades	12,0	70,6
Semilleros	2,0	11,8
Investigación	2,0	11,8
Ventas	1,0	5,9
TOTAL	17,0	100



4. ACTIVIDADES RELACIONADAS A LA MEJORA DE LA INFRAESTRUCTURA Y PROCESO DE LAS UNIDADES PRODUCTIVAS DE AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO Y SUSTRATOS PARA SIEMBRA DURANTE EL AÑO 2019.

Alejandro Rodríguez Morales

4.1. Visión integral de la problemática en la producción de *Cotesia flavipes* durante el año 2019, asociada a la presencia de microsporidios (*Nosema* sp) y otros contaminantes.

4.1.1. ANTECEDENTES

La producción del parasitoide *Cotesia flavipes* (HYM: Braconidae), principal agente para el control del barrenador común del tallo (complejo *Diatraea* spp), inició en el año 1984 y se ha mantenido de forma ininterrumpida a lo largo de 36 años. Durante este período se ha logrado una liberación total de 908,3 millones de avispas, en un área aproximada a las 151.382 ha, lo cual debe ser catalogado como un éxito en el ámbito nacional y regional, no solo por la cobertura y el excelente control del barrenador, sino también, porque ha contribuido a la no utilización de plaguicidas químicos y por ende, al mantenimiento de la biodiversidad y de la salud humana y ambiental en las regiones caleras.

Si bien, como cualquier ser vivo, sobre todo cuando se extrae de su nicho ecológico y se reproduce en un ambiente diferente como lo es un laboratorio, tanto el parasitoide (*Cotesia*), como su hospedante (*Diatraea*), año con año sufren alteraciones en su comportamiento y capacidad de reproducción. Fue a inicios del 2004 cuando se reportaron por primera vez signos compatibles con los de una afección por microsporidiosis (masas de huevos colores parduzcos, mezcladas con huevos en apariencia sanos; larvas enanas y blancuzcas; larvas desarrolladas, necrosadas, muertas sin causa aparente; crisálidas deformes con constricciones de color blanco-cremoso; y adultos con abdomen delgado y alas deformes) (Figura 24).



FIGURA 24.
Sintomatología asociada a microsporidiosis y confirmación visual mediante microscopía óptica (40x). FUENTE: Salazar, JD. 2004.

Ante esta sintomatología, la respuesta fue implementar medidas más rigurosas descartar el material presuntamente afectado y buscar asesoría especializada para obtener una confirmación de la presencia del patógeno y para aplicar un protocolo de control, aspectos que ese mismo año se consiguieron con la participación del Ing. Agr. Francisco Badilla Fernández. Se informó que el año 2004, a consecuencia de la contaminación del pie de cría con microsporidiosis, la producción fue de únicamente 11,7 millones y en el 2005 de 14,4 millones, tendiendo a recuperarse en el 2006 (40 millones).

A partir de la asesoría del Ing. Badilla, se estableció y aplicó un protocolo para reducir y eliminar la presencia del microsporidio clasificado dentro del género *Nosema*, ampliamente asociado a insectos como abejas y también, ampliamente reportados afectando pies de cría de *Diatraea* spp y la reproducción de *Cotesia flavipes*. Dicho protocolo incluyó:

1. Cópula de una hembra y un macho en cámaras individuales (x5), procediendo luego a analizar el contenido de los tubos de Malpighi, el intestino y la hemolinfa, en busca de microsporidiosis, para lo cual se utiliza un microscopio óptico a 40x de poder. Si ambos (hembra y macho) resultan libres del parásito, los huevos que la

hembra puso siguen el proceso; por el contrario, si alguno de los dos, o ambos resulta positivos, los huevos se descartan.

2. Estricta selección de huevos y larvas y su posterior exposición a 4-5°C por espacio de 5 días. Se ha reportado que las bajas temperaturas en un tiempo lo suficientemente prolongado, eliminan un porcentaje alto de los microsporidios, sin afectar a su hospedero.
3. Estricta selección de crisálidas y su sometimiento a estufa a 38-40°C por 24 horas. Se ha reportado que temperaturas por encima de los 38°C, inactivan a los microsporidios.
4. Aumento en la rigurosidad de los controles de ingreso de personal, desinfección de superficies y calzado, y uso de indumentaria (calzado, gabacha, malla para pelo, mascarilla, guantes), dependiendo de cada proceso en el laboratorio.

Debido a su ineficacia para controlar la presencia y los efectos del microsporidio, antes de enero de 2018, algunas de estas prácticas habían quedado discontinuadas; por ejemplo, el tratamiento con frío y calor. Por el contrario, todo lo referente al reforzamiento de medidas de prevención y control de la contaminación, han seguido implementándose y reforzándose, aunado a la implementación de una nueva forma de detección del parásito mediante técnicas en Biología Molecular, sobre lo cual se comentará más adelante.

4.1.2. FACTORES QUE HAN LIMITADO LA PRODUCCIÓN DE *Cotesia flavipes* DURANTE EL AÑO 2019.

Como se informó anteriormente, han sido múltiples los problemas que han afectado la producción de avispas durante el año 2019 y en un sentido cronológico del sistema productivo, se comentan a continuación los que han tenido mayor importancia.

4.1.2.1. Deficiente calidad de las masas de huevos de *Diatraea saccharalis*.

Se tiene la presunción, porque no se ha comprobado, que hembras contaminadas con microsporidios ovipositan masas de huevos pequeñas y con algunos huevos con coloración oscura, debiendo ser amarillo pálido (Figura 25). Estas masas de huevos son descartadas y en ciertos momentos en que el descarte ha sido importante, se produce un baja en la inoculación de vasos, con la consiguiente baja en la producción de larvas.



FIGURA 25.
Masas de huevos pequeñas y huevos con coloración oscura.

4.1.2.2. Contaminación de vasos con dieta de iniciación.

Durante el mes de mayo se presentó una persistente presencia de un contaminante desconocido en vasos con dieta de realimentación, que se manifestaba posterior a su inoculación con huevos de *D. saccharalis* (Figura 26) y que producía un olor “achichado” y una coloración blanquizca sobre la superficie de la dieta (síntoma conocido como “frasco lechoso”).

Al aislar al microorganismo presente se comprobó la presencia generalizada de una levadura no identificada, pero de idénticas características morfológicas a las levaduras que son componente de la dieta (Figura 27). Este hallazgo puso en evidencia que este microorganismo estaba sobreviviendo a la esterilización y por tanto, se realizaron dos estudios: uno para determinar la presencia de éste y otros microorganismos en otros componentes de la dieta, como fue confirmado en el germen de trigo y la harina de maíz; y el otro, para determinar si la autoclave presentaba algún tipo de problema que hiciera que el proceso quedara incompleto. Esto finalmente se descartó y la esterilización deficiente fue achacada a una sobrecarga del equipo (autoclave).

Adicionalmente, se revisó el estado de todos los componentes de la dieta, encontrándose que el sorbato de Potasio estaba vencido y la levadura, próxima a vencer. También se desinfectó la cámara de refrigeración que almacena estos productos y se modificó la cantidad de pesajes para producción de las dietas, de tal forma que se redujera significativamente su tiempo de permanencia en las bandejas de pesaje. Complementariamente, se están realizando diferentes experimentos con agentes antimicrobianos de origen natural como la *pimaracina* y *nisina*, y evaluando la sustitución de la levadura de cerveza.



FIGURA 26.
Presencia de levaduras en la dieta de iniciación.
A este síntoma se le conoce como “frasco lechoso”.

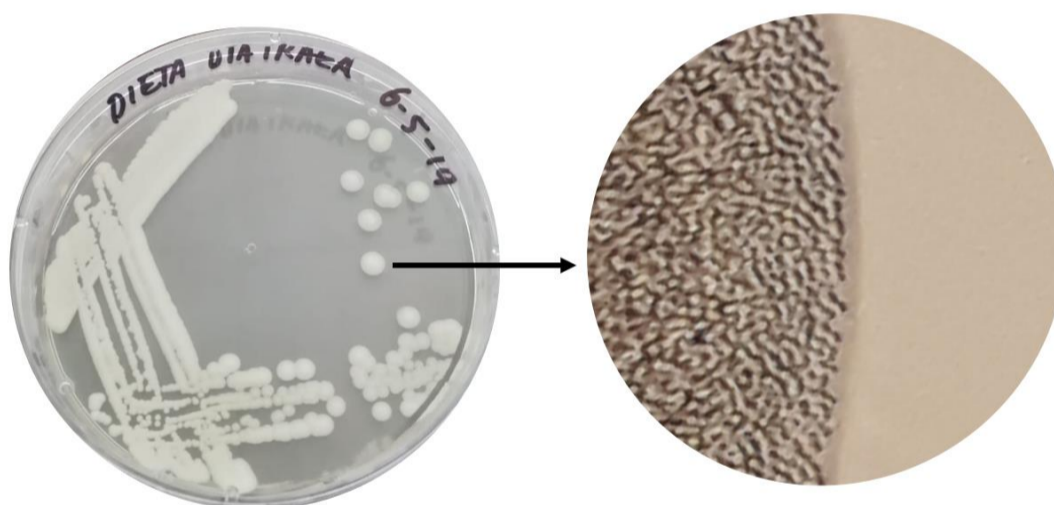


FIGURA 27.
Características morfológicas de la levadura encontrada contaminando la dieta de iniciación.

La Figura 28 muestra en los registros de frascos contaminados para el primer semestre del año. Cabe destacar que este problema disminuyó a niveles normales de contaminación sensiblemente en el mes de julio, como respuesta a las acciones llevadas a cabo.

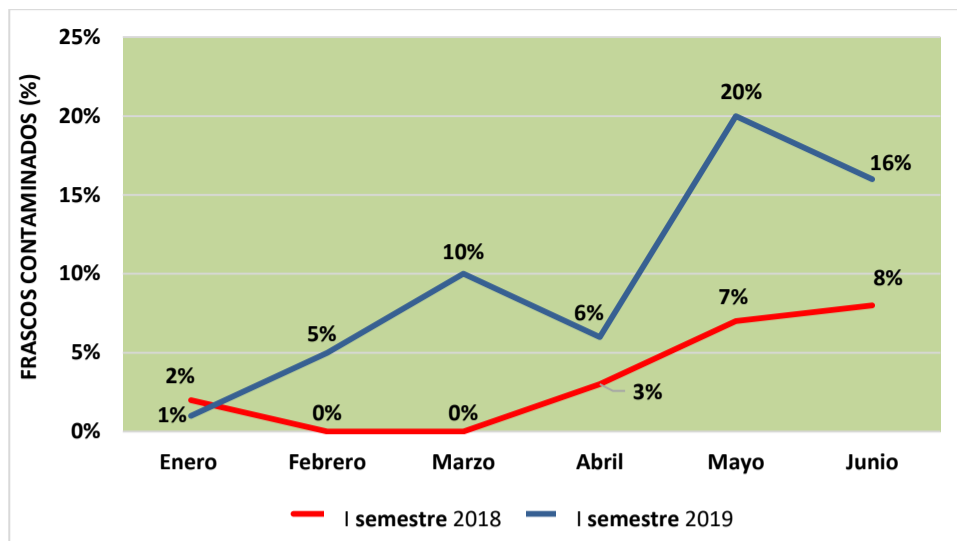


FIGURA 28.
Comparativo en el porcentaje de pérdida de vasos con dieta de iniciación para el primer semestre de los años 2018 y 2019.

4.1.2.3. Deficiente desarrollo de larvas.

Sin ninguna razón aparente, porque las masas de huevos son estrictamente seleccionadas y desinfectadas previo a su inoculación dentro de los frascos con dieta, y porque no hay una relación directa con la presencia de contaminantes en la dieta (como se explicó en el punto anterior), larvas en frascos pertenecientes a un mismo lote simplemente no crecen al mismo ritmo que sus hermanas y tienden a quedarse enanas (Figura 29). Esta sintomatología ha sido permanente a lo largo del 2018 y lo que va del año 2019, y es congruente con la presencia de microsporidios. Si bien este factor es importante pues limita la cantidad de larvas para ser parasitadas y para continuar como exclusivas para el pie de cría, es menor limitante respecto a la contaminación de la dieta (Punto 2) y la baja relación de hembras respecto a los machos de *C. flavipes*, lo que afecta fuertemente la parasitación, como se explicará más adelante.



FIGURA 29.
Heterogeneidad en el desarrollo de larvas por posible efecto de microsporidios. Arriba, larvas con buen crecimiento; abajo, larvas enanas. Nótese la diferencia en el consumo de la dieta.

4.1.2.4. Baja eficiencia en parasitación.

Como resultado directo de la mala calidad de larvas por posible afección por microsporidios, la baja relación de hembras y machos, y la afección por agentes patógenos (*Serratia* sp y otras bacterias aun no identificadas) (Figura 30), se ha observado para los meses de junio y sobretodo, julio del presente año, una pérdida moderada en la eficiencia porcentual de parasitación de larvas de *D. saccharalis* con *C. flavipes*.

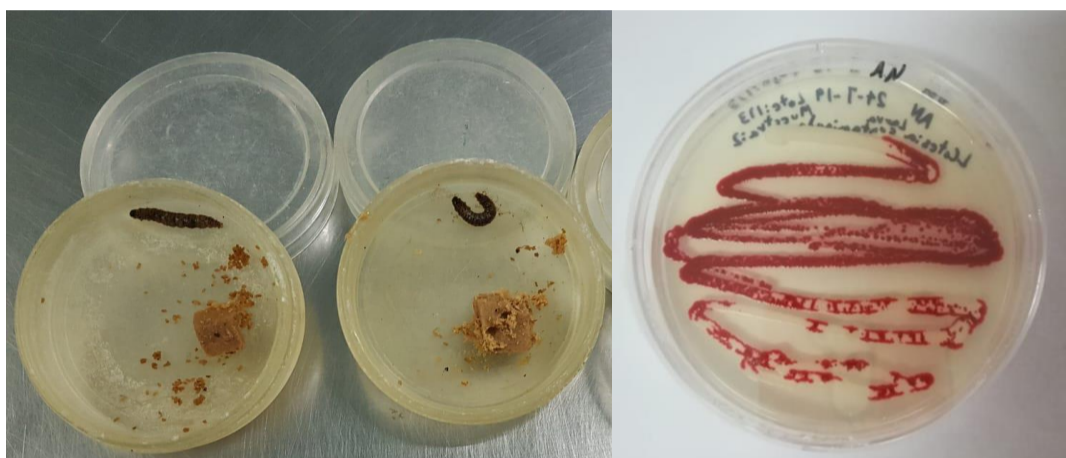


FIGURA 30.
Mortalidad de larvas parasitadas por efecto de bacterias asociadas al género *Serratia* y otras no identificadas.

De acuerdo al Cuadro 32, el promedio de eficiencia para los años 2009 a 2014 (6 años) y 2017 a julio de 2019 fue de 75,3%; sin embargo, para el primer semestre del año 2019 ha sido del 63,3% (12,0% menor). La Figura 31 muestra sin embargo, que la eficiencia ha seguido una tendencia a la baja desde el año 2009, posiblemente por el efecto ya mencionado de los microsporidios.

CUADRO 32.
Eficiencia de laboratorio (%) en la parasitación de *Diatraea saccharalis* por *Cotesia flavipes*.

AÑO	EFICIENCIA (%)
2009	82,64
2010	80,36
2011	85,09
2012	69,04
2013	76,95
2014	72,7
2017	62,07
2018	85,62
2019	63,3*
PROMEDIO	75,31

*Datos de enero a junio.

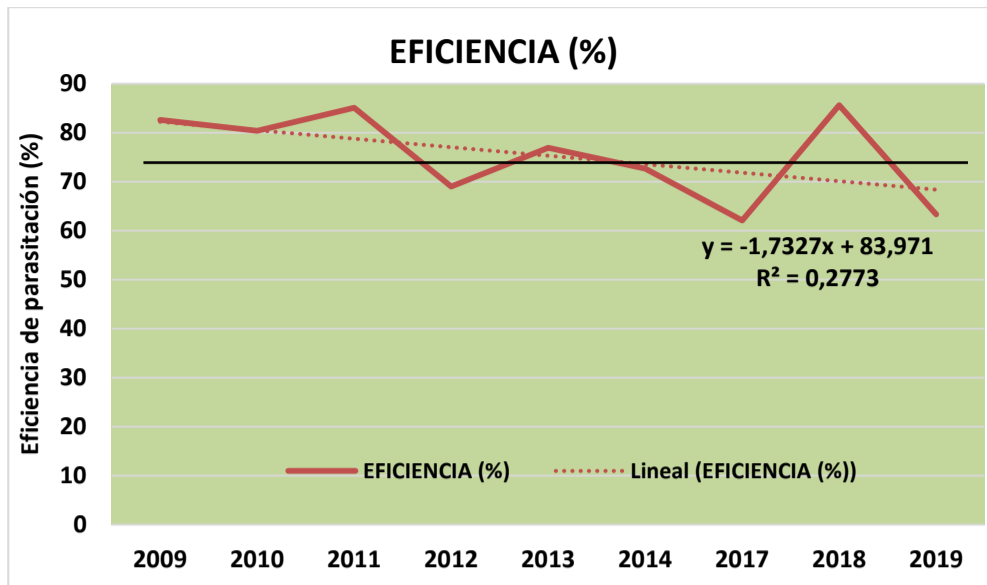


FIGURA 31.
Eficiencia en la parasitación de *Diatraea saccharalis* con *Cotesia flavipes* y línea de tendencia para los periodos 2009 a 2014 y 2017 a julio de 2019.

4.1.2.5. Baja calidad de masas de pupas de *Cotesia flavipes*.

Muy posiblemente asociado a la mala calidad de las larvas, se ha mostrado también entre marzo y mayo de 2019, una baja calidad en las masas de pupas de *C. flavipes*., respecto a estos mismo índices durante el año 2018. La Figura 32 muestra la cantidad promedio mensual de avispas viables y fallidas para el primer semestre de los años 2018 y 2019; se aprecia en la figura, que a partir de marzo de 2019, inicia el decremento en la cantidad de avispas viables y aumenta el de avispas fallidas, aunque este último en menor proporción. La Figura 33 muestra puparios normales y puparios con escasa cantidad de pupas. La baja calidad de masas de pupas redunda en un menor número de insectos por vaso, que contienen 20 masas. La Figura 34 muestra que si bien en 2018 y 2019 la cantidad total de avispas por vasos es menor a 1500, a partir de marzo de 2019, la situación se agravó, lo que obliga a aumentar el número de masas para obtener el número y peso de puparios y así llegar al estándar de 1500 avispas por vaso.

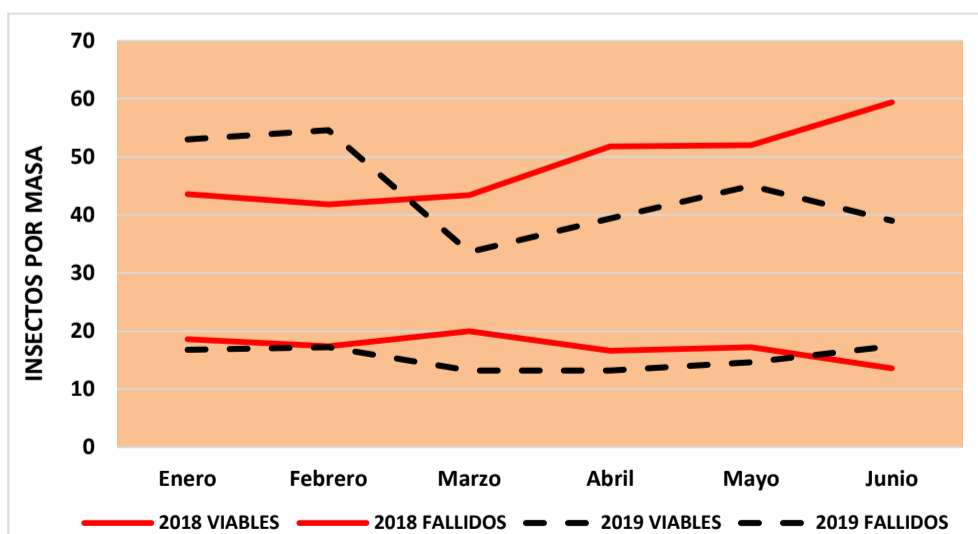


FIGURA 32.
Cantidad de avispas viables y fallidas por masa de puparios de *Cotesia flavipes* para el primer semestre de los años 2018 y 2019.

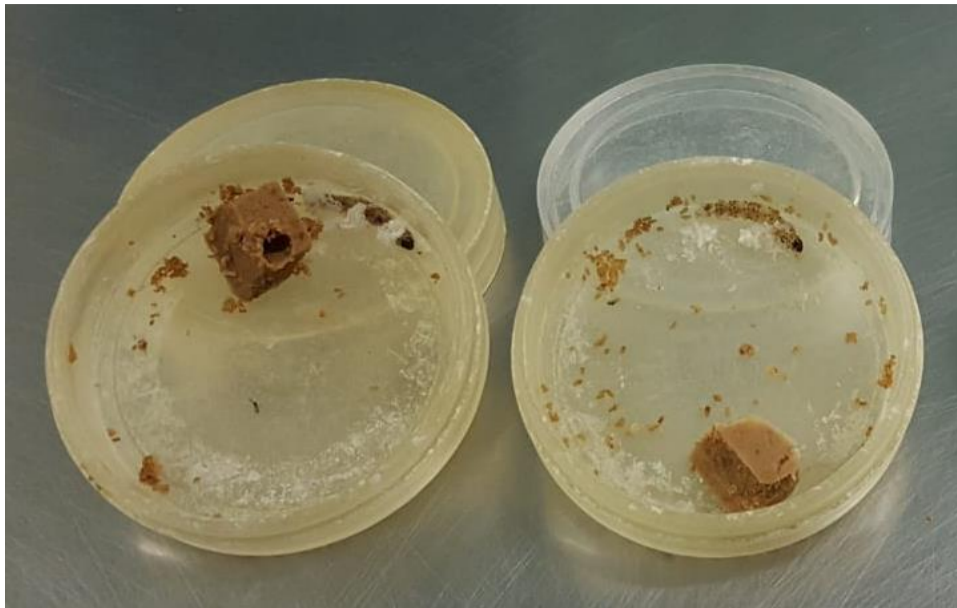


FIGURA 33.
Baja calidad de masas de pupas de *Cotesia flavipes*.

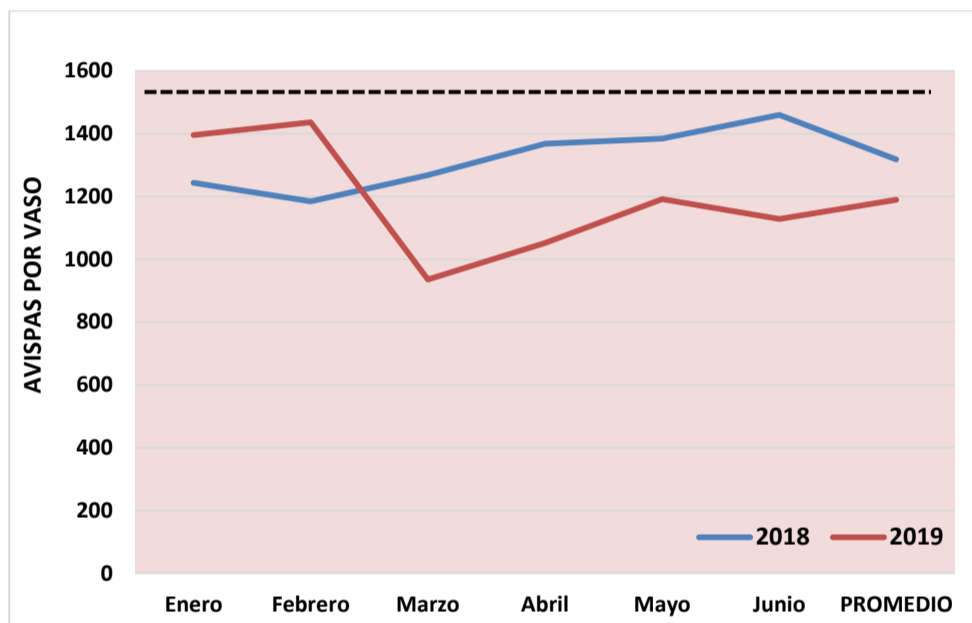


FIGURA 34.
Cantidad total de *Cotesia flavipes* por vaso para el primer semestre de los años 2018 y 2019.

4.1.2.6. Baja proporción hembras/machos de *Cotesia flavipes*.

Otro factor importante que ha mermado la producción de avispas, ha sido la baja relación hembras y machos, sobre todo en el mes de febrero y mayo del 2019, que en cierta medida fue coincidente con el año 2018. Este factor reduce la cantidad de larvas a parasitar. Nótese que en la Figura 35 (proporcionada por Ing. Agr. Ana Isabel Alpizar, Control de Calidad), el promedio ideal en la relación hembras/machos debería ser de 2,5 (2,5 hembras por cada macho); sin embargo, los registros para el primer semestre de 2018 y 2019 muestran promedios que no llegan a 1,5. Si bien está claro que la presencia de microsporidios afecta directamente la calidad de las larvas y por consiguiente, el número de avispas que emergen de cada larva parasitada, no está muy claro si esta situación o algún otro problema nutricional o de índole microbiológica, intervienen en la reducción de la nacencia de hembras.

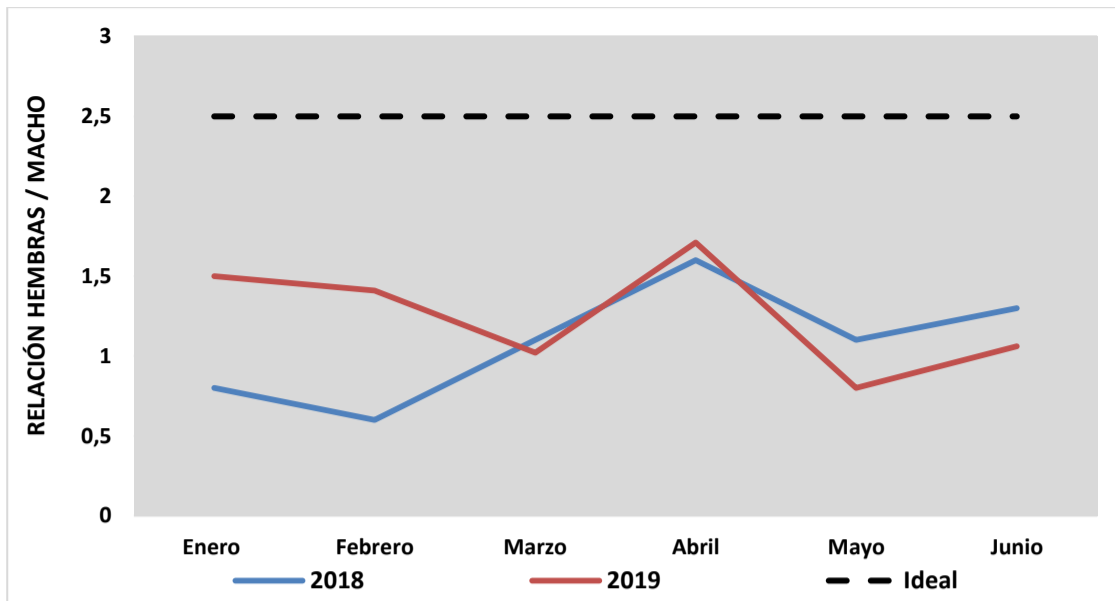


FIGURA 35.
Baja proporción hembras/machos de *Cotesia flavipes*.

4.1.2.7. Presencia ambiental de microorganismos contaminantes.

A lo largo del año 2019 no se han presentado picos fuertes de presencia de microorganismos en el ambiente dentro del laboratorio, aunque de acuerdo a datos proporcionados por la Ing. Ana Isabel Alpizar, Control de Calidad, se presentó un ligero incremento en la presencia del hongo *Penicillium* sp en el mes de setiembre y de bacterias entre los meses de julio y setiembre, y en el mes de diciembre (Figura 36). No obstante, debido a que estos niveles no coinciden con los períodos críticos de presencia de contaminantes, i en la naturaleza de éstos, no se considera que este haya sido un factor detonante. No obstante, la herramienta de plaqueo sigue siendo clave para anticiparse a cualquier problema de contaminación.

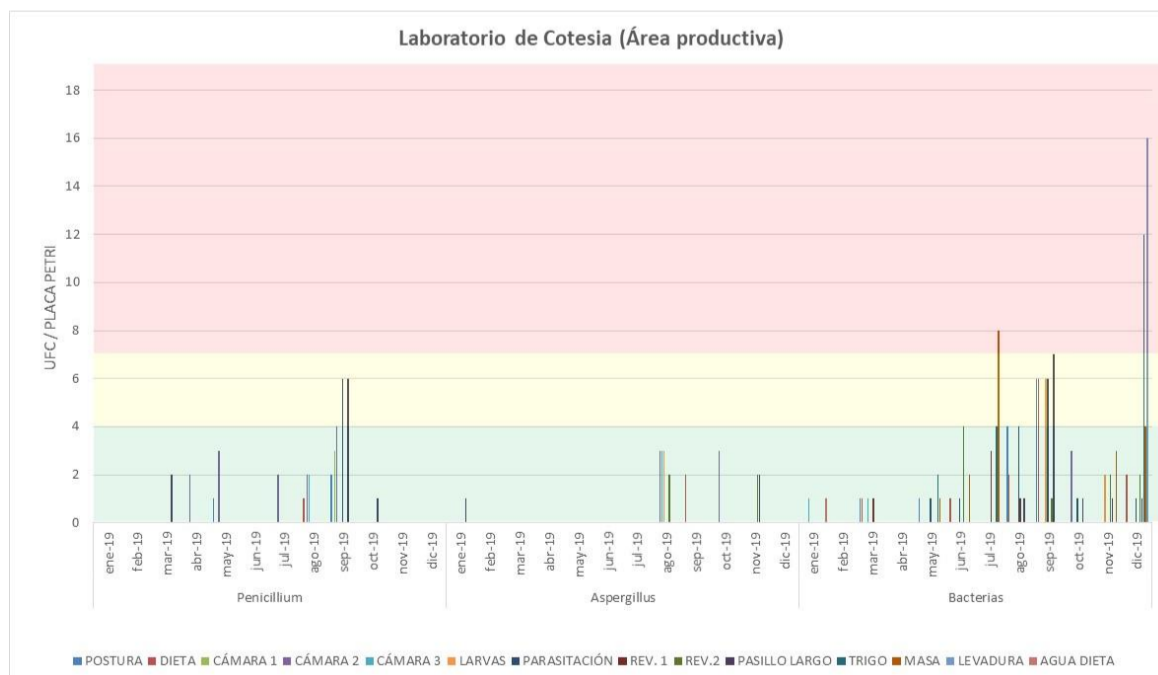


FIGURA 36.
Resultados de plaqueo ambiental durante el año 2019.
Datos proporcionados por Ing. Agr. Ana Isabel Alpizar.

4.2. ACCIONES DE PREVENTIVAS Y PALIATIVAS IMPLEMENTADAS DURANTE AÑOS 2018 Y 2019.

4.2.1. Reforzamiento en los controles para evitar el ingreso de contaminantes.

Se continúan implementando los protocolos para la prevención de ingreso de contaminantes vigentes desde el año 2017, reforzando el control de ingreso al laboratorio de todo el personal (productivo y miscelánea), visitantes, equipos de mantenimiento de equipos; y se hace un uso estricto de la indumentaria (calzado, malla, gabacha, guantes y mascarilla). Actualmente se evalúan los productos Citrogen HG (desinfectante de origen natural) y CETHIX (ácido peracético), para desinfección de superficies, manera rotativa con el Natamicin.

4.2.2. Adquisición de lavadora industrial para lavado y desinfección de cajitas de poliestireno para la crianza de *Diatraea saccharalis*.

Luego de realizar varias pruebas de lavado utilizando lavadoras industriales utilizadas para la limpieza y desinfección de “big bags” en la terminal portuaria de Punta Morales, se concluyó que el uso de estos equipos mejoran la calidad y reduce el tiempo de lavado de cajas de poliestireno. Por tal motivo, en el mes de marzo de 2019 se adquirió una lavadora industrial marca Milnor de 60 libras de capacidad, la cual aún no se ha puesto en funcionamiento debido a que su lugar definitivo de instalación todavía no se ha construido (Figura 37).



FIGURA 37.
Lavadora industrial adquirida para mejorar la calidad del proceso de desinfección de cajas de poliestireno.

4.2.3. Adquisición de cámara de flujo laminar doble para preparación de dieta e inoculación de huevos en frascos.

Hasta el año 2018 se contaba con cámaras de transferencia que no permitían trabajar bajo condiciones estrictamente asépticas. A finales del año 2018 se adquirió una cámara de flujo laminar doble que permite trabajar bajo estas condiciones; sin embargo, dado su tamaño y el proyecto de mejoras en infraestructura que se realizó durante los meses de enero a abril de 2019, solo pudo introducirse en la sala de dieta hasta el mes de junio del ese año (Figura 38).



FIGURA 38.
Cámara de flujo laminar para preparación de dietas e inoculación de huevos.

4.2.4. Cambio de cielorraso y cambio de ventanas.

Con el objeto de disminuir la presión ambiental de contaminantes y facilitar las labores de limpieza y sanitización, durante los meses de enero a abril del año 2019, se realizó el cambio total del cielorraso de fibrolit en mal estado, por tablilla PVC, y el cambio total de ventanas de marco de madera, por marco de aluminio con los paños corredizos (Figura 39). Se ha comprobado que la madera es una fuente importante de contaminantes microbianos y da refugio a ácaros y a insectos.



FIGURA 39.
Cambio de cielorraso y ventanales.

4.2.5. Reparación de estufa y certificación de crisálidas.

Se reparó el sistema de calentamiento y control de temperatura de la estufa y se retomó el tratamiento de crisálidas a 70°C, variando el tiempo de exposición de 40 a 20 minutos, para evitar su muerte y deformidad. Se ha comprobado mediante PCR, que este tratamiento reduce la frecuencia de aparición de microsporidios (aspecto que se tratará más adelante).

4.2.6. Ampliación de espacio para nacerencia de adultos.

Se adquirió una tercera jaula de nacerencia de adultos para evitar su hacinamiento y para aislar material certificado o de interés particular (Figura 40).

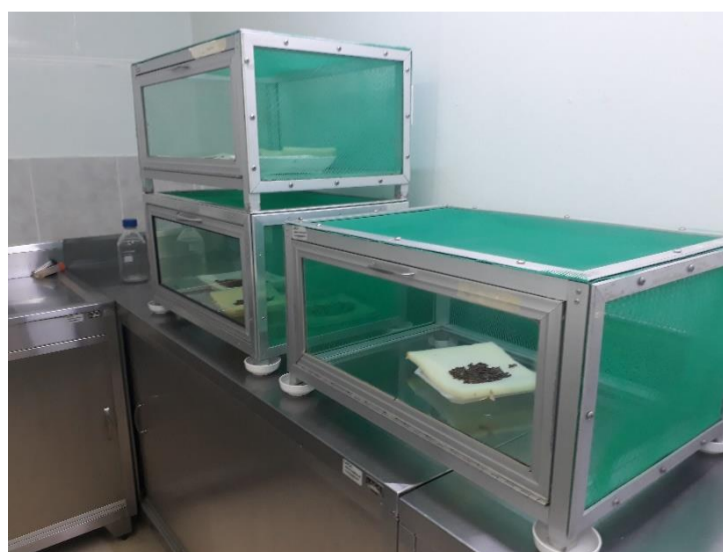


FIGURA 40.
Construcción de una tercera jaula para la nacerencia de adultos de *Diatraea saccharalis*.

4.2.7. Implementación de certificación de ausencia de *Nosema* sp mediante técnicas de PCR de punto final (Karen Oviedo, Alejandro Rodríguez).

Con el apoyo de la Biol. Molecular Karen Oviedo, se implementó un protocolo para detección de *Nosema spp*, el microsporidio parásito de *D. saccharalis* a nivel de adultos, luego de su cópula individualizada. Este proceso implica la extracción del ADN de las muestras, su amplificación mediante PCR con imprimadores específicos para *Nosema* sp, y finalmente, el corrido del producto del PCR en un gel de agarosa, para su posterior revelación, a efecto de determinar si el patrón de bandas (cantidad de pares de bases), es congruente con el control positivo utilizado (Figura 41). Todo el material declarado como negativo a la presencia del parásito, sigue su proceso hacia la limpieza del pie de cría; mientras que el material declarado positivo, es desechado. De esta forma se pretende ir “limpiando” los pies de cría del microsporidio y eventualmente, de otros contaminantes microbiológicos.

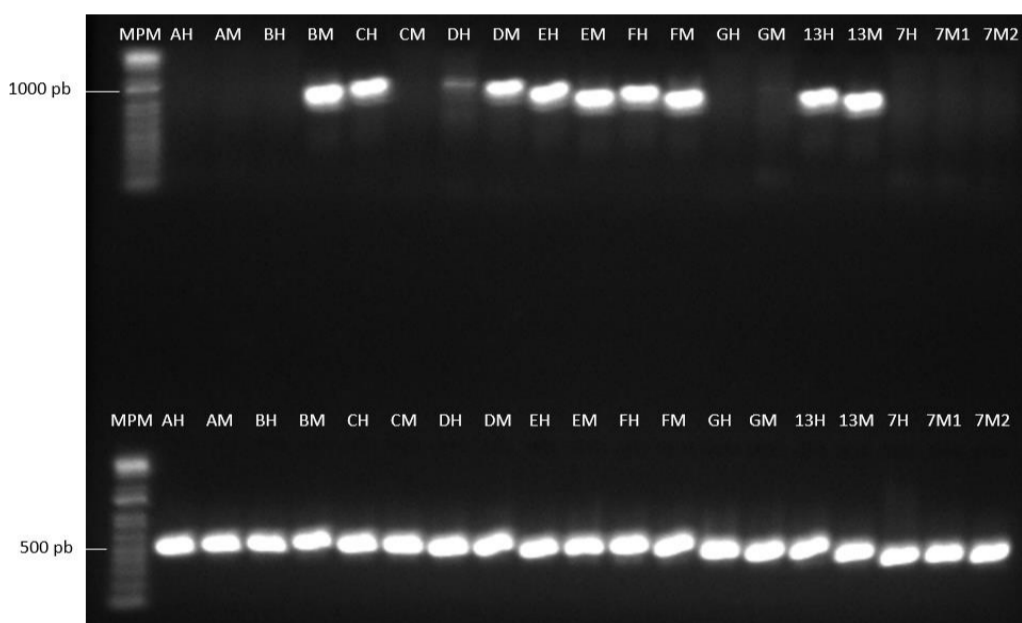


FIGURA 41.
Gel de agarosa mostrando bandas congruentes con *Nosema* sp detectado en adultos de *D. saccharalis*. Banda de 1245 pares de bases.

Este protocolo ha sido también validado para analizar, huevos, larvas y crisálidas de *D. saccharalis*, pero también, pupas y adultos de *C. flavipes* y dietas, agua y otros insumos que se utilizan rutinariamente. Se conoce que *C. flavipes* puede fungir como vector de este microorganismo.

Actualmente el laboratorio de Biología Molecular está en la capacidad de analizar hasta 50 muestras por semana, entregando los resultados en un plazo de 48 horas. Asimismo, al contar el laboratorio con PCR en tiempo real, se podrá realizar un estudio que permita dilucidar cuál es el punto crítico en concentración de *Nosema* sp, a partir del cual *D. saccharalis* o incluso *C. flavipes*, experimentan cambios en su comportamiento y pierden su capacidad de reproducirse y de parasitar.

Durante el año 2019 se analizó un total de 276 parejas de adultos de *Diatraea* provenientes del laboratorio (cópula en parejas), así como 16 hembras y 18 machos provenientes de campo. Los resultados mostraron una alta incidencia del microorganismo en el pie de cría del laboratorio, siendo que el 42,6% de las hembras y el 48, de los machos estaban contaminados; mientras que los especímenes provenientes de campo, presentaron el 37,5 y 27,8% de incidencia en hembras y machos, respectivamente. Ante estos resultados queda de manifiesto la importancia de la técnica para prevenir la introducción de material contaminado al laboratorio (Cuadro 33).

CUADRO 33.
Incidencia (%) de *Nosema* sp en adultos de *Diatraea saccharalis* provenientes del laboratorio y de campo.

Procedencia	Sexo	Positivos	Negativos	Total	Incidencia (%)
Laboratorio	Hembras	118	159	276	42,6
	Machos	134	142	276	48,6
Campo	Hembras	6	10	16	37,5
	Machos	5	13	18	27,8
Total	-	263	324	586	-

Por otro lado, al analizar la presencia de *Nosema* en huevos, larvas y crisálidas de *Diatraea* provenientes de laboratorio y campo, se detectó una incidencia total en huevos (n=3) y del 17,4% en larvas provenientes del laboratorio (n=155); mientras que la incidencia en material de campo fue del 66,7% para crisálidas (n=3) y no se encontró en larvas (Cuadro 34)

CUADRO 34.
Incidencia (%) de *Nosema* sp en posturas, crisálidas y larvas de *Diatraea saccharalis* provenientes de laboratorio y campo.

Procedencia	Positivos	Negativos	Total	Incidencia (%)
Posturas laboratorio	3	0	3	100
Crisálidas campo	2	1	3	66,7
Larvas laboratorio	27	128	155	17,4
Larvas campo	0	8	8	0
Total	32	137	169	18,93

Finalmente, la presencia de *Nosema* en pupas y adultos de *C. flavipes* provenientes de laboratorio y campo indicó una incidencia del 80% y el 81,8% en pupas (n=30) y adultos (n=11) del laboratorio; mientras que la incidencia del parásito en pupas (n=2) y adultos (n=3) provenientes de campo alcanzó el 50% y 100%, respectivamente (Cuadro 35).

CUADRO 35.
Incidencia (%) de *Nosema* sp en pupas y adultos de *Cotesia flavipes* provenientes del laboratorio y de campo.

Estadío	Positivos	Negativos	Total	Incidencia (%)
Pupas laboratorio	24	6	30	80
Pupas campo	1	1	2	50
Avispas laboratorio	9	2	11	81,82
Avispas campo	3	0	3	100
Total	37	9	46	80,43

El diagnóstico de incidencia no solamente abarcó las diferentes formas biológicas de *D. saccharalis* y de *C. flavipes*, sino que también abarcó a la dieta de iniciación que se utiliza para desarrollar a la primera. En ese sentido, se analizó un total de 18 muestras resultando en un 11,1% de detección de *Nosema* (Figura 42). Estos resultados son congruentes con lo descrito en la literatura en donde se afirma que *Nosema* se puede transmitir de forma horizontal, a la progenie, pero también de forma horizontal debido a la contaminación de materiales y utensilios de laboratorio, con heces de insectos enfermos.

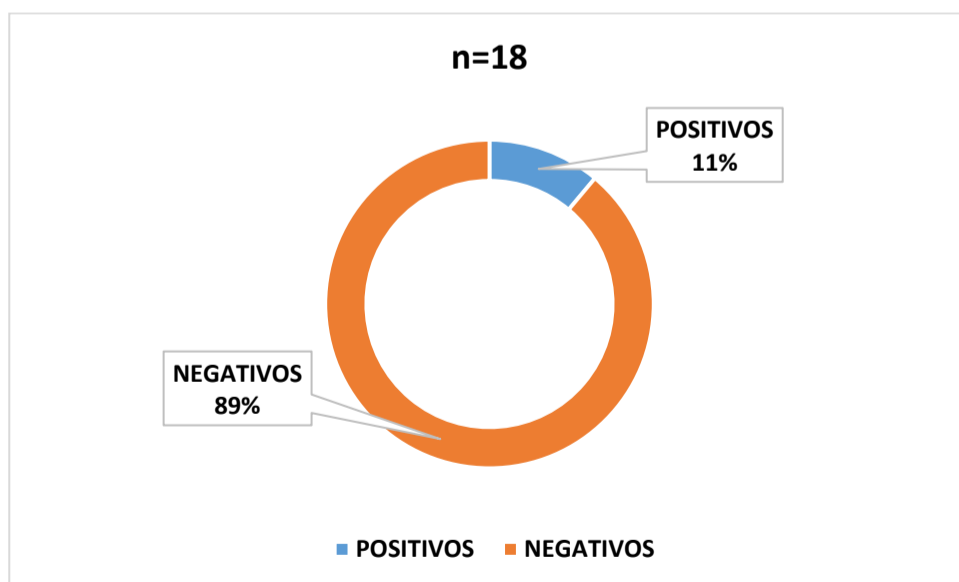


FIGURA 42.
Incidencia (%) de *Nosema* sp en muestras de dieta para *Diatraea saccharalis*.

4.2.8. Reducción de cantidad de pesajes de dieta y carga de esterilización de componentes de la dieta.

Mediante el cultivo de muestras de germen de trigo, levadura de cerveza y masa de maíz, se logró determinar que su esterilización por autoclave por 25 minutos a 121°C y 1,5 kg/cm², era ineficaz para eliminar la presencia de microorganismos contaminantes. Por tal motivo, se realizó una evaluación de la eficiencia de la autoclave, determinándose un buen funcionamiento de la misma, y que posiblemente los contaminantes podían sobrevivir a este proceso debido a la alta carga de material de la autoclave, con la consiguiente pérdida en la transferencia y exposición al calor, o por una re-contaminación durante su período de almacenaje (en algunos casos de más de un mes). Por esta razón se redujo la cantidad de dieta a preparar, de tal forma que las bandejas no estuvieran almacenadas por más de 7 días. Asimismo, se redujo la carga de la autoclave. Se informa que está en proceso la adquisición de una autoclave de mayor capacidad (200 L) y eficiencia.

4.2.9. Reemplazo del algodón como tapa de frascos, por tapa plástica.

Ante los elevados índices de contaminación de la dieta por hongos, posiblemente a consecuencia de un ineficaz proceso de esterilización y alto porcentaje de humedad dentro del frasco bajo el sistema de taponamiento de los frascos con algodón, lo cual incluso provocaba el ahogamiento de muchas larvitas recién emergidas, se evaluó el uso de una tapa plástica con una perforación central (con o sin tapa de algodón) o con varias perforaciones pequeñas, utilizando como control al frasco con tapa de algodón. La hipótesis planteada fue que las tapas plásticas permitirían un mejor intercambio gaseoso y por ende, menor incidencia de hongos y mayor desarrollo larval.

Las larvas sometidas estos tratamientos fueron medidas y pesadas al 14^{avo} días luego de su emergencia, comprobando que las que fueron sometidas a la tapa plástica con numerosos huecos, mostraron un tamaño y peso estadísticamente similar al control y a la vez, diferenciándose de los demás tratamientos; además, no mostraron signos de contaminación por hongos. La Figura 43 muestra los dos tipos de tratamientos (con algodón y con tapa plástica) y las Figuras 44 y 45 muestran los resultados obtenidos en largo y peso de larvas según tratamiento.

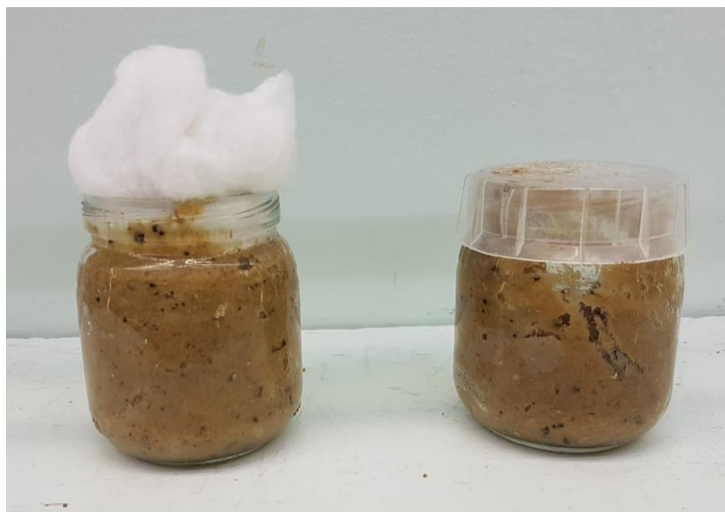


FIGURA 43.

Intercambio de algodón por tapa plástica en frascos inoculados con huevos de *Diatraea saccharalis*.

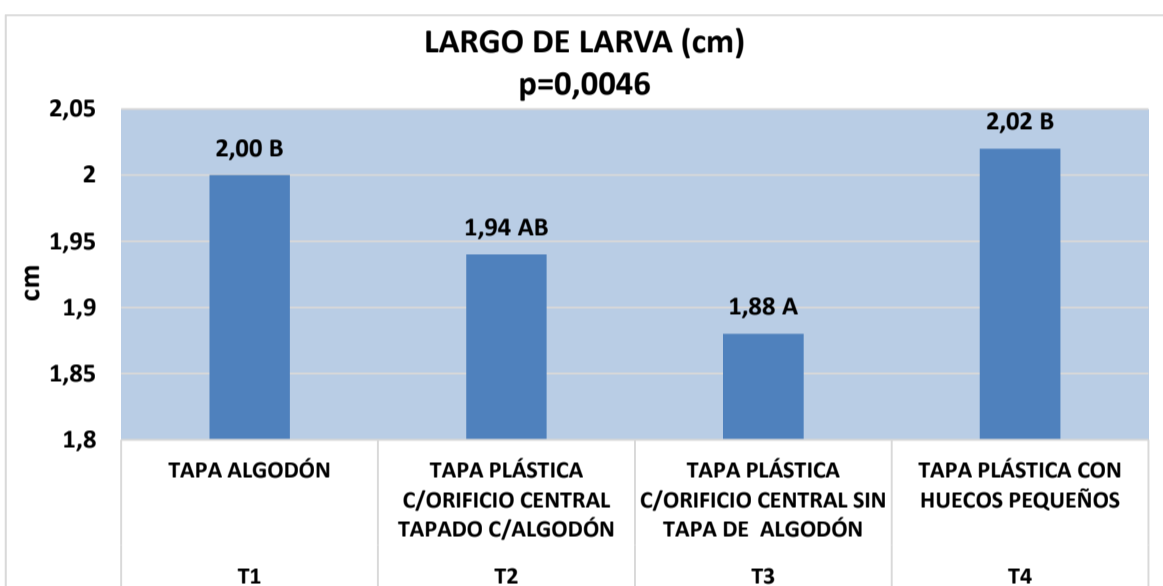


Figura 44.

Longitud media (cm) de larvas de 14 días de emergidas que fueron alimentadas con dieta en frascos con tapa de algodón y tapas plástica.

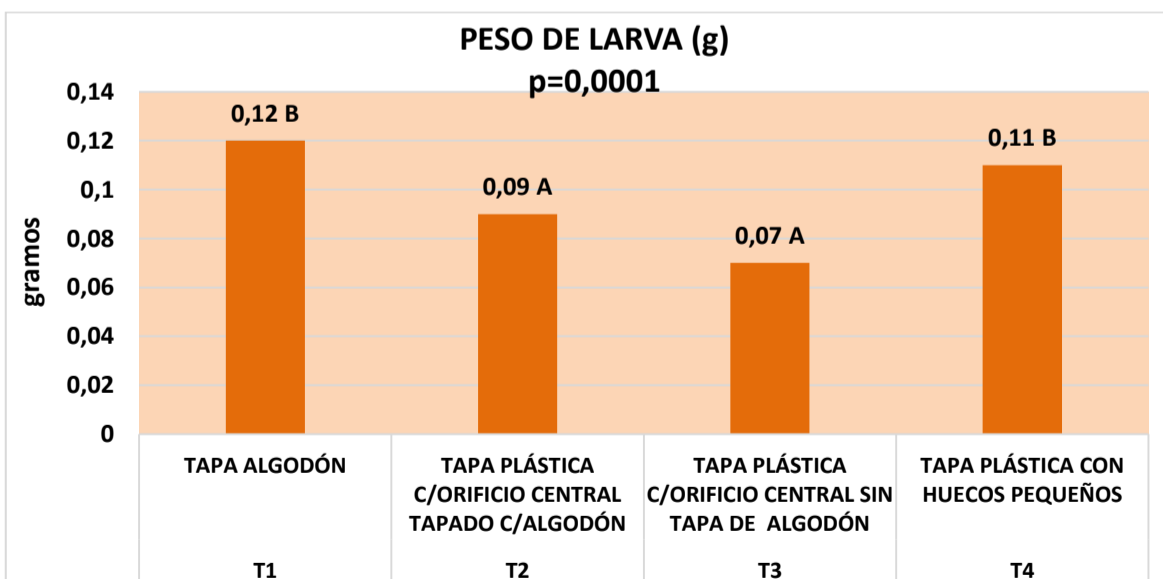


Figura 45.

Peso medio (g) de larvas de 14 días de emergidas que fueron alimentadas con dieta en frascos con tapa de algodón y tapas plástica.

4.2.10. Evaluación preliminar de productos antiparasitarios, antibióticos y suplementos alimenticios como estimulantes para el aumento en peso de larvas de *Diatraea saccharalis*. (Alejandro Rodríguez Morales, Ana Isabel Alpízar Alfaro).

Dada la urgencia de mitigar el efecto del microsporidio *Nosema* sp, se estableció un ensayo de laboratorio para determinar la compatibilidad de larvas de *Diatraea saccharalis* con diferentes productos antiparasitarios, antibióticos y suplementarios de dieta, estableciendo que, si los productos eran compatibles, podría utilizarse como agentes para el tratamiento de la nosemosis.

Con esa premisa, los productos fueron incorporados a las dieta de iniciación y se utilizó al antibiótico como control. Luego de 14 días de desarrollo de las larvas, se evaluó su peso, encontrando que únicamente los productos Fumagilin, Doxiciclina y Amprolio produjeron larvas estadísticamente con pesos menores que el control Amoxicilina y los otros productos evaluados ($p=0,0001$).

Casualmente, tanto Fumagilín como Amprolio (albendazol), son productos que se citan en la literatura como agentes preventivos y curativos de la nosemosis. No obstante el resultado permite dilucidar un grupo importante de productos para evaluar contra *Nosema* sp, pues no afectan el desarrollo larval de *D. saccharalis*. El Cuadro 36 muestra los tratamientos y su efecto, utilizados en el experimento. La Figura 46 muestra los resultados obtenidos en cuanto a peso de larvas (g).

CUADRO 36.

Productos evaluados para estudiar su compatibilidad con *Diatraea saccharalis*.

TRATAMIENTO	PRODUCTO	EFEECTO
1	Giaccocide	anticoccidios
2	Metromidazol	antiparasitario protozoos y bacterias
3	Ketoconazol	fungicida
4	Enterol	Antidiarréico
5	Trisulfalite	Antibacteriano
6	Ganaverm (albendazol)	endoparasitida amplio espectro
7	Nozevit Plus	suplemento alimenticio abejas
8	Fumagilin	antibiótico nosemosis
9	Doxiciclina	antibiótico amplio espectro
10	Amprolio	antiprotozoico
CONTROL	Amoxicilina	antibiótico amplio espectro

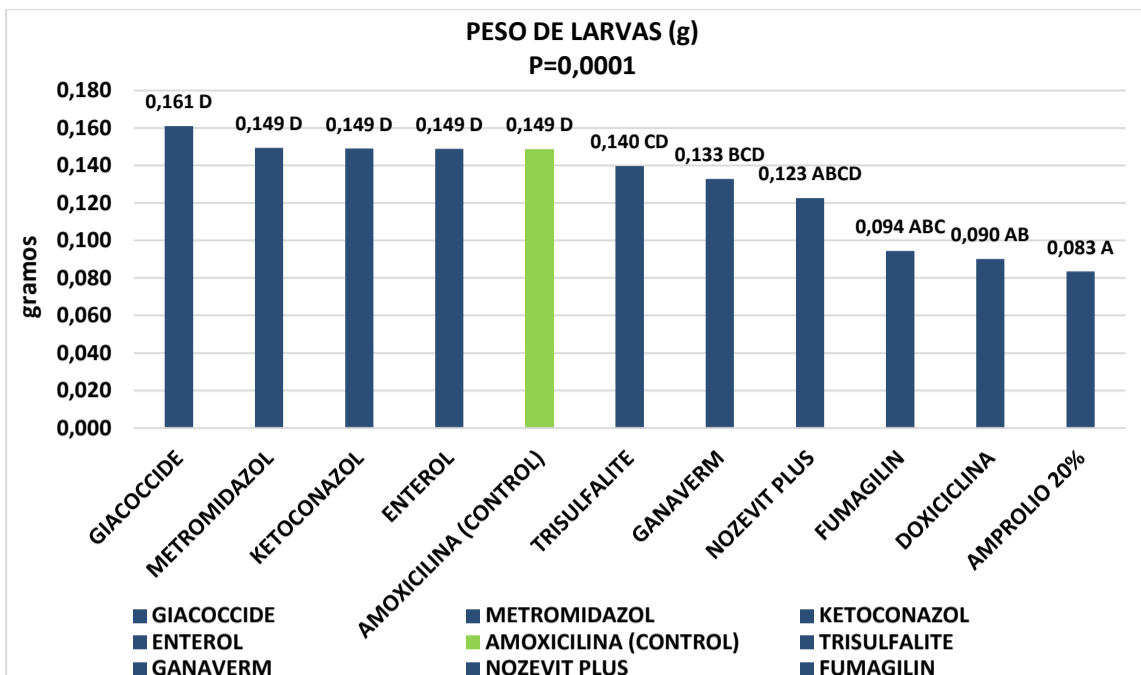


Figura 46.

Peso medio (g) de larvas de 14 días de emergidas alimentadas con dieta conteniendo diferentes productos.

Complementariamente a estos estudios, se tuvo la oportunidad de investigar sobre la eficacia de otros productos antibióticos como agentes de control de la bacteria Gram (-), *Serratia marcescens*, un patógeno altamente virulento dentro del laboratorio, que afecta larvas de *D. saccharalis* parasitadas por *C. flavipes*. Para tal efecto se contó con la participación de la estudiante Susana Solís Calvo, estudiante de pregrado de la UNA. A continuación se resume los resultados y alcances de su estudio. Asimismo, se mantienen evaluaciones preliminares con dos antibióticos naturales: la nicina y la piramicina; los resultados de estas pruebas serán posteriormente reportados.

4.2.11. Eficacia de antibióticos incorporados a la dieta de *Diatraea saccharalis* sobre la inhibición in vitro de *Serratia marcescens* y su posible efecto sobre los principales parámetros productivos del parasitoide *Cotesia flavipes* (Susan Solís Calvo, Ana Isabel Alpízar Alfaro, Alejandro Rodríguez Morales).

Resumen

Se realizaron concretamente tres pruebas cuantitativas identificadas por el número consecutivo registrado por el laboratorio como lote 170 y lote 176, los cuales fueron tratados con los antibióticos Gentamicina y Marbocyl a diferentes dosis, y el lote 182 tratado con Gentamicina, Marbocyl, Cloranfenicol, Levofloxacina y Amoxicilina. Se encontró que la Amoxicilina presenta mejores resultados en la condición corporal de las larvas; sin embargo, no existe una diferencia significativa en comparación con el tratamiento testigo. Además, se realizaron pruebas cualitativas donde se aplicaron diferentes dosis de antibiótico directamente en un plato petri con el aislamiento de la bacteria; siendo Marbocyl el único antibiótico que presentó un halo de inhibición.

Palabras clave

Diatraea saccharalis~ *Cotesia flavipes*~ *Serratia marcescens*~ control biológico~ alimentación~ antibióticos

Abstract

Three quantitative tests were carried out. These tests are identified by their consecutive number registered by the laboratory as lot 170 and lot 176, which were treated with antibiotics Gentamicin and Marbocyl at different doses, and lot 182 treated with Gentamicin, Marbocyl, Levofloxacin and Amoxicillin. It was found that Amoxicillin has better results in the larval body condition and weight; however, there was no significant difference compared to the control treatment. Moreover, various qualitative tests were performed in which different doses of antibiotics were applied directly to bacterial cultures growing in a Petri dish; Marbocyl was the only antibiotic that showed a zone of inhibition.

Keywords

Diatraea saccharalis~ *Cotesia flavipes*~ *Serratia marcescens*~ biological control~ food~ antibiotics

Introducción.

El barrenador común del tallo de la caña de azúcar, *Diatraea spp* (LEP: crambidae) es una plaga importante en el cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*, Poaceae) debido a la dificultad para controlar los daños con prácticas culturales o agroquímicos, una vez que se encuentran dentro de los tallos, por lo que el control biológico mediante el parasitoide *Cotesia flavipes* (HYM: braconidae), es la mejor alternativa. Para poder llevar a cabo técnicas de control biológico como esta, se requiere de la formulación de dietas artificiales eficientes que llenen las necesidades nutricionales de los estadios inmaduros de *D. saccharalis*, que es la especie que se utiliza como hospedero del parasitoide; además, las dietas deben de contener ingredientes específicos que eviten su contaminación con diferentes tipos de microorganismos, principalmente bacterias y hongos, los cuales si no se controlan, pueden provocar la pérdida total de la producción y del pie de cría del hospedero y el parasitoide.

Este proyecto surgió a causa de la ineficacia del antibiótico amoxicilina que se ha utilizado por no menos de 10 años como control de bacterias que contaminan la dieta y afectan el desarrollo de las larvas. Recientemente, se han observado brotes importantes de la bacteria *Serratia marcescens*, que tiene una alta virulencia sobre larvas parasitadas, haciendo que estas mueran antes de que el parasitoide finalice su desarrollo. Se sospecha que esta bacteria ha generado resistencia debido a la utilización de un mismo antibiótico por tanto tiempo continuo. Por esta razón resulta urgente la investigación orientada a generar dietas artificiales con la capacidad de disminuir los índices de contaminación, aumentar la productividad y asegurar la sostenibilidad del producto. La producción de *Cotesia flavipes* es fundamental para los productores cañeros asociados a **Liga Agrícola Industrial de la Caña Azúcar (LAICA)** y para el ingreso económico generado de su exportación a otros países.

Materiales y métodos

Efecto de los antibióticos sobre el peso de larvas de *D. saccharalis* de 14 días y la producción de *C. flavipes* (Lote 182).

Para esta prueba se incorporaron los diferentes antibióticos productos a frascos conteniendo 66 ml de dieta de iniciación. La dosificación se basó en la recomendación del ingrediente activo por kilogramo de peso corporal. En ese sentido la cantidad de cada producto fue la siguiente: Amoxicilina: 0,08 g, Levofloxacina: 0,08 g, Cloranfenicol: 0,08 g, Gentamicina: 1,32 ml, Marbocyl: 0,56 g. Se utilizó un testigo sin antibiótico como control negativo. Luego de la inoculación de las posturas, los frascos se incubaron en la sala de desarrollo a 23 °C con fotoperíodo de 12 horas y se mantuvieron ahí hasta que las larvas cumplieran 14 días de desarrollo. En ese momento se seleccionó un grupo de 50 larvas por tratamiento para cuantificar el peso (g).

Todos los resultados fueron procesados mediante el programa estadístico R Studio, para conocer si existen o no diferencias significativas entre los tratamientos, aplicando la prueba de varianzas ANOVA; y para tener una mejor visualización de los datos se implementaron los boxplot o gráficos de cajas y bigotes, lo cual facilita la interpretación de los datos mínimos, máximos y promedios.

Por otra parte, un grupo de larvas de 14 días de cada tratamiento fue parasitado con *C. flavipes* y las masas de pupas del parasitoide resultantes, fueron analizadas en cuanto peso de pupario y relación hembra/macho. Para analizar estos datos se corrieron pruebas como la LSD (least significant difference), así como pruebas Tuckey y Cbind (Colum bind), para el análisis de la proporción hembras/ machos. En este caso, la cantidad de muestras para todas las variables fueron distintas, ya que esto dependía de la disposición de material en el laboratorio y el tiempo para la toma de datos. Únicamente para el conteo de avispas de *C. flavipes* en proporción de hembras y machos se muestrearon 5 cajas Petri por tratamiento seleccionadas al azar.

Antibiogramas (evaluación cualitativa).

Las pruebas cualitativas consistieron en antibiogramas en los cuales se expone el cultivo del microorganismo que se desea controlar, a discos impregnados con los productos que se desean evaluar. Si luego de un lapso determinado de incubación que normalmente es de 72 horas, se forman halos transparentes alrededor de los discos, esto indicaría que el producto es eficaz; de lo contrario se descarta como candidato a seguir evaluando.

Para realizar los antibiogramas se requirió de: los cultivos bacterianos frescos creciendo en placas Petri conteniendo el medio de Agar Nutriente; 100 ml de un solución estéril de cada antibiótico a la misma concentración utilizada en la dieta; y discos de papel filtro estéril recortados de forma circular de aproximadamente un centímetro de diámetro. Bajo condiciones de asepsia en una cámara de flujo laminar, los discos fueron impregnados con la solución del antibiótico y luego fueron colocados sobre la superficie de los cultivos bacterianos de 48 horas de crecimiento (4 por placa Petri). Luego de un período de 72

horas de incubación a 27°C por 72 horas, se procedió a verificar la formación o no del halo de inhibición alrededor de los discos.

Resultados

Efecto de los antibióticos sobre el peso de larvas y crisálidas de *D. saccharalis*.

La Figura 37 muestra los resultados de la ANOVA o prueba de varianzas para la variable peso de larvas del lote 182; si bien no fueron declaradas diferencias estadísticas entre tratamientos ($p=0,109$), es importante rescatar que este valor no está muy alejado de la probabilidad de que exista alguna diferencia entre los tratamiento.

El peso medio de larvas tratadas con amoxicilina fue ligeramente mayor respecto a los demás tratamientos y el testigo. Si bien el hecho de no haberse declarado diferencias significativas entre tratamientos vuelve irrelevante la realización de otras pruebas para determinar el nivel de separación de las medias, al aplicar las pruebas Tuckey y LSD, se observaron resultados interesantes (Figura 47). Esto es importante porque se puede dilucidar con gran exactitud, cuales productos benefician o afectan el desarrollo larval. Como se observa en el Cuadro 37, los productos que tradicionalmente se utilizaron continuamente entre los años 1984-2000 (Cloranfenicol) y 2001-a la fecha (Amoxicilina), permitieron que las larvas alcanzaran los mayores pesos corporales.

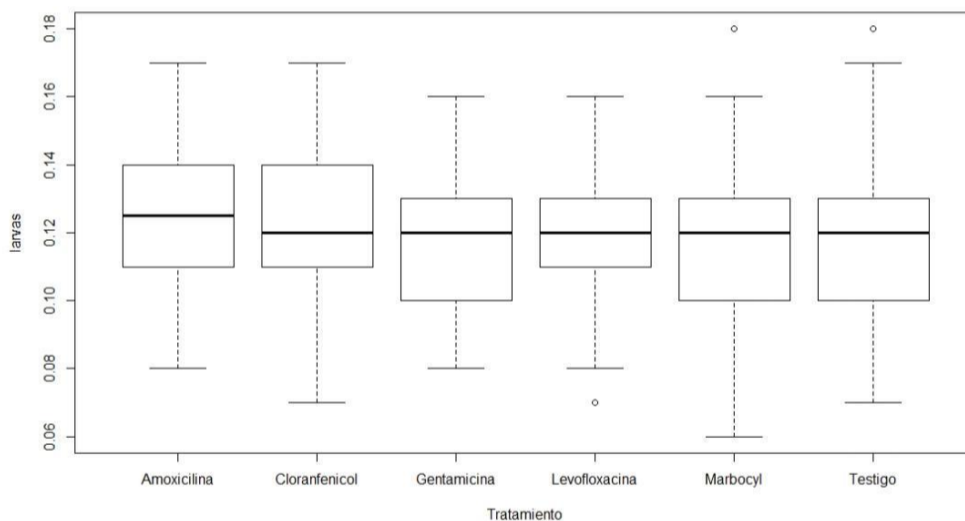


FIGURA 47.

Distribución de los resultados de los pesos en gramos de las larvas de *Diatraea saccharalis* según cada tratamiento, lote 182. $P=0,1090$.

CUADRO 37.

Resultados de la prueba LSD para la variable peso de larvas del lote 182.

	larvas <dbl>	groups <fctr>
Amoxicilina	0.1274	a
Cloranfenicol	0.1216	ab
Testigo	0.1202	ab
Levofloxacina	0.1178	b
Gentamicina	0.1174	b
Marbocyl	0.1158	b

Como se observa en la Figura 48, el tratamiento con Cloranfenicol registró un promedio de peso más alto de crisálidas de *D. saccharalis*; no obstante, la ANOVA no permitió declarar diferencias significativas entre los tratamientos ($p=0,0359$). Estos resultados se confirmaron en la prueba de LSD (Cuadro 38), en el cual no muestran diferencia para ninguno de los tratamientos.

La prueba de LSD es una opción estadística que realiza un análisis exploratorio de las diferencias entre tratamientos, con la ventaja de que es simple, consistente y utilizable para pruebas poco balanceadas o con desigualdad de varianzas (Fallas, 2012). Esta prueba clarifica los resultados por grupos, lo que permite ver fácilmente cuál o cuáles de ellos se encuentran mayormente diferenciados.

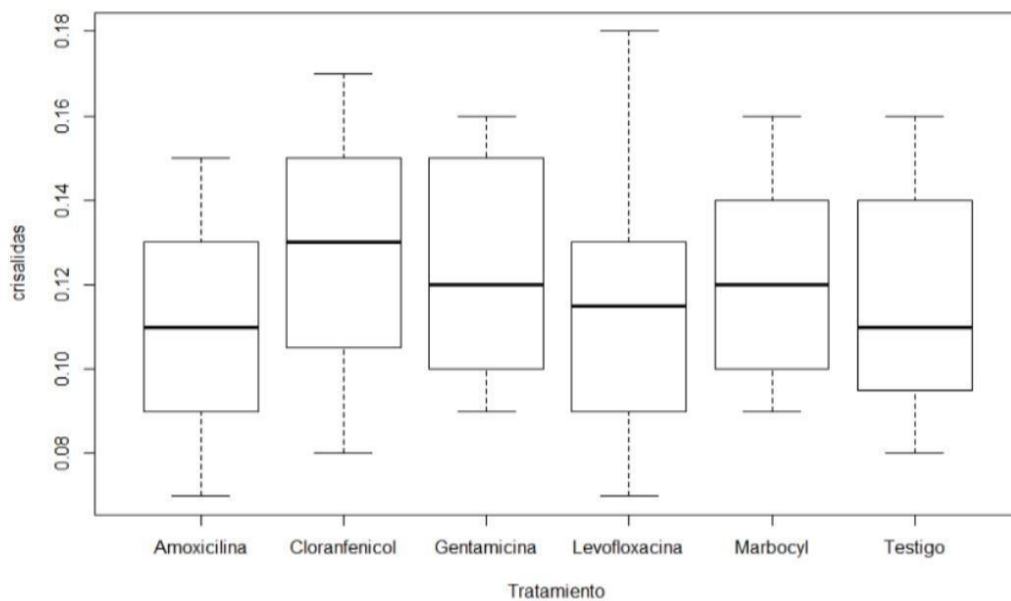


FIGURA 48.
Distribución de los resultados de los pesos en gramos de las crisálidas de *Diatraea saccharalis* según cada tratamiento, lote 182. $P=0,0359$.

CUADRO 38.
Resultados de la prueba LSD para la variable peso de crisálidas del lote 182.

	Crisalidas <dbl>	groups <fctr>
Cloranfenicol	0.1252083	a
Gentamicina	0.1240426	a
Marbocyl	0.1222449	ab
Testigo	0.1157447	ab
Levofloxacina	0.1135417	b
Amoxicilina	0.1128571	b

Peso de puparios de *Cotesia flavipes*.

Para el caso de las larvas parasitadas se observan datos muy homogéneos y en concordancia con los valores la distribución observada en la Figura 49, se aprecia que la Amoxicilina es el antibiótico que genera un promedio mayor de peso de masas o puparios. No obstante, no se declararon diferencias estadísticas entre los tratamientos ($p= 0.739$).

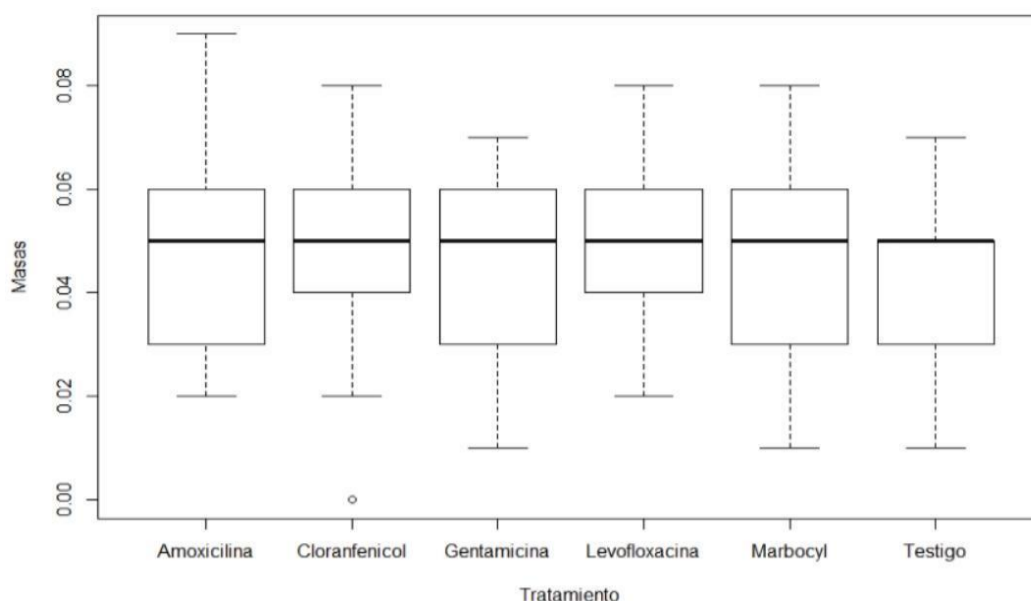


FIGURA 49.
Distribución de los resultados de los pesos en gramos de las masas de *Cotesia flavipes* según cada tratamiento, lote 182.

En este caso la Amoxicilina es tomada como referencia (intercepto) para indicar que este tratamiento genera una mayor proporción de hembras, así como el tratamiento cloranfenicol y testigo que también resultaron ser significativos (Cuadro 39).

CUADRO 39.
Resultados de la prueba cbind para la proporción de machos y hembras de *Cotesia flavipes*, lote 182.

Coeficientes	Estimado	Error	Valor P
(Intercepto)	-0,57	0,15	0,000121***
Cloranfenicol	0,22	0,19	0,268107
Gentamicina	0,55	0,18	0,003319**
Levofloxacina	-0,02	0,20	0,896860
Marbocyl	0,57	0,32	0,075746
Testigo	1,12	0,23	1,51e ⁻⁰⁶ ***

Resultados cualitativos.

Los antibiogramas permitieron identificar a Marbocyl como el único antibiótico que presento un halo de inhibición sobre *Serratia marcescens* (Figura 50); sin embargo, al observarse esto luego de 144 horas de incubación, aproximadamente, demuestra que el poder inhibitorio de este antibiótico a la concentración utilizada, no fue realmente suficiente para controlar una infección aguda por esta bacteria y por ende, no hubiera sido eficaz para evitar la muerte de las larvas parasitadas.

Amoxicilina: 0,0125 g



Gentamicina: 0,2 ml



Levofloxacina: 0,0125 g



Cloranfenicol: 0,0125 g



Marbocyl: 0,085 g único antibiótico que presentó

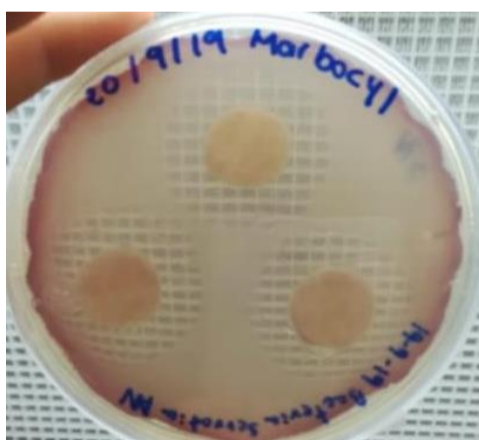


FIGURA 50.

Antibiogramas con la bacteria *Serratia marcescens*. Únicamente Marbocyl mostró halo inhibitorio.

Discusión

La industria farmacéutica ha ido modificando la estructura química de las moléculas de antibióticos ya conocidos y buscó, asimismo, nuevos antibióticos que fuesen venciendo los mecanismos de resistencia adquiridos por las bacterias. Sin embargo, aunque estas nuevas moléculas fueron eficaces durante unos años, las bacterias de nuevo desarrollaban nuevos mecanismos que incluían la resistencia a estos nuevos antibióticos (Torres, 2012).

Las bacterias Gram negativas como es el caso de *Serratia marcescens*, a diferencia de las Gram positivas, se encuentran rodeadas por una membrana externa y presentan diferentes mecanismos de resistencia hacia los antibióticos, por lo que la efectividad de los mismos puede variar. Uno de los principales mecanismos de resistencia es la producción de enzimas capaces de unirse al fármaco, y hidrolizarlo (Forbes *et al*, 2009).

El mecanismo de resistencia más común utilizado por *S. marcescens* está mediado por enzimas que modifican al antibiótico. Estas enzimas modifican su blanco al agregar grupos acetilos (N-acetiltransferasas), grupos fosfatos (Ofosfottransferasas) o nucleótidos (O-nucleótido transferasas). De esta manera, el aminoglicósido es incapaz de unirse a su blanco en el ribosoma. La resistencia también puede estar dada debido a mecanismos bacterianos que provocan la alteración del ribosoma mismo, la impermeabilización de la célula o el aumento en la expresión de los canales de eflujo (Mahlen, 2011 citado por Di Venanzio y García, 2014).

De manera general, el tratamiento con amoxicilina presentó mejores resultados en los parámetros de peso de larvas de *D. saccharalis* y pesos puparios de *C. flavipes*. De acuerdo con Rodríguez y Murillo (2010), la amoxicilina como tal, puede actuar contra este tipo de resistencia al unirse a las enzimas y inhibirlas destruyendo la síntesis de la pared bacteriana y potenciando el espectro de acción.

Marbofloxacino (Marboxyl) es un agente antimicrobiano sintético de acción bactericida, perteneciente al grupo de las fluorquinolonas, que actúa mediante inhibición de la DNA girasa. Es eficaz frente a un amplio rango de bacterias Gram positivas (en particular *Staphylococcus*, *Streptococcus*) y Gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Proteus* spp, *Klebsiella* spp, *Shigella* spp, *Pasteurella* spp, *Haemophilus* spp, *Moraxella* spp, *Pseudomonas* spp, *Brucella canis*), así como *Mycoplasma* spp. Esto explica su relativo buen desempeño en la inhibición de *S. marcescens*.

Conclusiones y recomendaciones.

- Amoxicilina es el antibiótico que ha generado mejores resultados en cuanto al peso de las larvas de *D. saccharalis* y peso de masas del parasitoide *C. flavipes*, sin embargo, no ha sido lo suficiente mente significativo en comparación al testigo por lo que su uso puede estar siendo una pérdida económica para el laboratorio.
- Marbocyl fue el único antibiótico que presento un halo de inhibición en las pruebas de antibiograma, sin embargo, para que esto ocurriera tardó demasiado tiempo, por lo que se considera que a esa dosis es posible que no sea efectivo para la sobrevivencia de las larvas.
- Los resultados obtenidos permiten descartar aquellos antibióticos que se observaron deficientes y plantear nuevos diseños de pruebas con aquellos antibióticos que presentaron cierta incidencia positiva en términos de pesos, principalmente.
- Si bien el presente estudio dilucidó cierto efecto inhibitorio por parte de Marbocyl sobre *S. marcescens*, es necesario profundizar en las dosis y sus efectos sobre el desarrollo larval, antes de intentar introducirlo como componente de la dieta para *D. saccharalis*. Por esta razón, se recomienda extremar las medidas de higiene y sanitización en la sala de parasitación, que es donde se ha detectado que las larvas adquieren la bacteria. Para ello se debe de utilizar permanentemente guantes, tapabocas y cofia.

Bibliografía

- Di Venanzio, G. y García, E. (2014). *Mecanismos de patogénesis de Serratia marcescens*. Facultad de Ciencias bioquímicas y farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario, Argentina. [PDF] Recuperado de: <https://core.ac.uk/download/pdf/144474702.pdf>
- Fallas, J. (2012). *Análisis de varianza comparando tres medidas o más*. [Archivo PDF] Recuperado de: http://www.ucipfg.com/Repositorio/MGAP/MGAP-05/BLOQUE-ACADEMICO/Unidad-2/complementarias/analisis_de_varianza_2012.pdf
- Forbes, B. Sahm, D., Weissfeld, A., y Trevino, E. (2009). *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Panamericana S.A. 12ed. Madrid, España.
- Rodríguez, J y Murillo, D. (2010). *Fármacos que modifican las funciones del aparato digestivo*. Editorial Panamericana-UNAM.
- Torres, C. (2012). *Resistencia bacteriana a los antibióticos siete décadas después del Fleming*. Academia de Farmacia "Reino de Aragón" Zaragoza. [PDF] Recuperado de: <http://www.academiadefarmaciadearagon.es/docs/Documentos/Documento48.pdf>

4.2.12. Otras acciones importantes.

- **Introducción de material de campo.** Esta práctica es de suma importancia para revigorizar el pie de cría de *D. saccharalis* y de *C. flavipes*. De acuerdo a la información del personal del laboratorio, en los últimos años ha sido nula la introducción de *D. saccharalis* y esto definitivamente ha tenido un efecto negativo en el vigor de ambos pies de cría; por el contrario, con cierta frecuencia se ha introducido *C. flavipes*. Durante el año 2019 se ha introducido material proveniente del ingenio Taboga, en donde se ha encontrado brotes de *D. saccharalis*; sin embargo, mucho del material viene parasitado por *C. flavipes*, por lo que se requiere mayor constancia y cantidad en la traída de este material. Ahora se cuenta con la ventaja del análisis mediante biología molecular para asegurar la ausencia de *Nosema* sp. Resultados preliminares de material de campo luego de dos ciclos transcurridos, indican que una fracción pequeña del material está libre del parásito, aunque su adaptación al laboratorio va a requerir más tiempo.
- **Introducción de pie de cría certificado como libre de *Nosema* sp.** Mediante la detección de ADN de *Nosema*, se puede desacartar material contaminado y solamente introducir material libre del parásito.
- **Liberación controlada de *D. saccharalis* en la Estación Experimental.** Esta labor implica el establecimiento de estañones con una variedad altamente susceptible al berrenador y el acondicionamiento de un sitio cerrado y apto para que al hacer la liberación de hembras copuladas, su progenie pueda establecerse. El objetivo es intentar dar rusticidad al pie de cría de *D. saccharalis*. Esta práctica no se ha realizado por parte del personal del programa MIP, aun contando con la jaula y las plantas.
- **Introducción de *D. guatemalaella* como posible sustituto a *D. saccharalis*:** esta labor se puede llevar a cabo con la participación de pasantes.
- **Mejora en infraestructura y equipamiento.** Finalmente se hacen las acciones pertinentes para colocar puertas de vidrio, ampliar el área de lavado y secado, instalar la lavadora adquirida, adquirir una autoclave de mayor volumen, reemplazar aires que constantemente fallan por ser su antigüedad, adquirir dos purificadores de aire, e incrementar los niveles productivos en febrero a no menos de 120 vasos/día para producir al menos 5 millones de avispas extra, con incrementos del 10% sostenido hasta mayo, cuando se sostendría la producción en 160 vasos hasta el mes de setiembre.



4.3. Resultados del proceso de reconstrucción y mejoramiento del proceso de producción de sustratos para siembra (Alejandro Rodríguez Morales).

La segunda etapa de intervención de la planta de sustratos se efectuó entre los meses de febrero y agosto de 2019; esta comprendió las siguientes acciones:

- Cobertura total de las tolvas de abono orgánico y de tierra sin moler, con el material deslizante Tivar 88, esto para facilitar que el material baje hasta el molino sin dificultad (Figura 51).

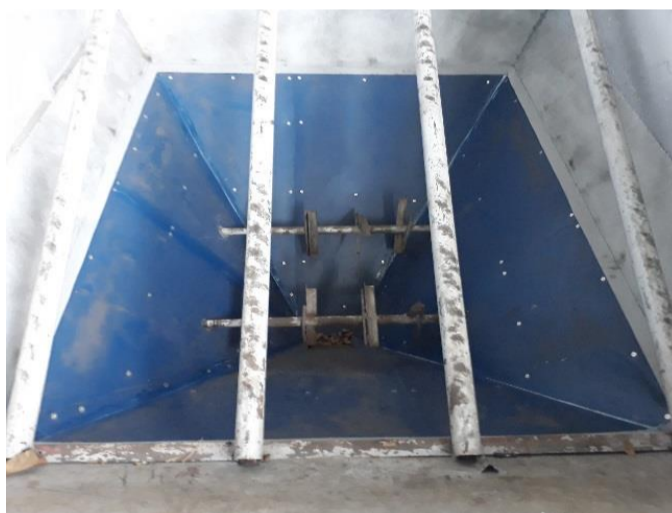


FIGURA 51.
Recubrimiento de tolvas de material crudo con lámina súper deslizante Tivar 88.

- Sustitución de la tolva de recibo de material tratado térmicamente construida en lámina de hierro, con ángulos de 45°, por una tolva construida en acero pulido, con ángulos de 70°; a esta nueva tolva se le colocaron dos motores cuyos ejes a lo interno de la tolva, mueven constantemente el material de tal forma que no se compacte y tenga la fluidez requerida (Figura 52).



FIGURA 52.

Construcción de tolva de material tratado con ángulo de 70° y lámina de acero pulido.

- Eliminación del sistema de alimentación de la tolva de empaque, el cual constaba de un ducto tipo “tobogán” y un elevador de cangilones, por un ducto de alimentación con un tornillo sin fin, propiamente desde la base de la tolva de recibo de material tratado, a la tolva de empaque. Inicialmente este ducto se construyó con un ángulo de aproximadamente 15° en ascenso, debido a la altura de la boca de la tolva de empaque; sin embargo, esto provocaba atascos y por esta razón, se optó por modificar el sistema de empaque, para reducir la altura de la tolva y de esta forma dejar el tornillo sin fin prácticamente en posición horizontal; las pruebas realizadas fueron positivas (Figura 53).



FIGURA 53.

Ducto con tornillo sin fin para trasegar sustratos tratados al área de empaque.

- Modificación de la romana móvil mediante rieles, por una romana de plataforma móvil con el display fijo. Con este trabajo se agilizó el proceso de pesaje y de empaque del material en sacos y a granel (big bags) (Figura 54).



FIGURA 54.
Reconstrucción de la romana para el pesaje de producto final.

- Instalación de ducto de drenaje en toldos de acopio de lodo; con este trabajo se reduce significativamente el humedecimiento de este material y lo hace más apto para su mezcla con los otros componentes del substrato (Figura 55).



FIGURA 55.
Construcción de ducto de drenaje para evitar el humedecimiento de materiales para la elaboración de substratos.

El recurso económico invertido en esta segunda etapa de reparaciones ascendió a los ₡5.948.466 (us\$9.865,0), monto que se desglosa de la siguiente manera:

- a) Materiales con ₡3.017.490 (us\$5004,0; 50,7% del total).
- b) Mano de Obra con ₡2.005.000 (us\$3.325,0; 33,7% del total).
- c) Motores y componentes eléctricos con ₡925.956 (us\$1.536,0; 15,6% del total).

Quedan aun algunos puntos de mejora como la reparación del techo plástico de los toldos que presentan varias perforaciones; la colocación de cortinas en estos mismos toldos; la mejora en la extracción de partículas en suspensión durante el proceso de molido, modificando la relación de las poleas que mueven el aspa del extractor, con el objeto de darle mayor velocidad y capacidad de extracción; esta mejora se combina con la adaptación del variador de frecuencia para aumentar las revoluciones del motor. Es necesario además sellar algunas fugas de aire de las mangueras que accionan los pistones de las compuertas de las tolvas de pesaje, lo cual sería importante para evitar que el compresor trabaje más de la cuenta, gastando más electricidad de la necesaria.

5. INVESTIGACIONES PARA EL DESARROLLO DE NUEVOS INSUMOS BIOTECNOLÓGICOS A BASE DE MICROORGANISMOS CON EFECTO BIOESTIMULANTE Y BIOFERTILIZANTE PARA EL CULTIVO DE LA CAÑA DE AZÚCAR.

5.1. Desarrollo de un protocolo para la producción masiva del hongo *Trichoderma* sp (Alejandro Rodríguez Morales, Ana Isabel Alpizar Alfaro).

Justificación

Trichoderma spp es un hongo ampliamente utilizado en el control de patógenos de origen fúngico, lo cual es debido a su capacidad de producir altas concentraciones de quitinasas que hidrolizan la quitina estructural en la pared celular de los hongos. Además, es reconocido por su acción estimulante en el crecimiento vegetal, sobre todo a nivel de raíz, debido a que utiliza diferentes mecanismos como la producción de fitohormonas y la solubilización de elementos químicos como el Fósforo y el Potasio. Si las especies del género *Trichoderma* no están catalogadas estrictamente como agentes de control de nematodos, existen muchas referencias que demuestran que su presencia a nivel de la rizosfera de las plantas, dificulta el reconocimiento de la raíz por parte de los nematodos, y a la vez, constituye una barrera física para su ingreso. En ambos casos se reduce significativamente la infección del nematodo.

El cultivo de la caña de azúcar está permanentemente asediado por múltiples organismos que desde el punto de vista fitosanitario, afectan diferentes órganos de la planta y provocan pérdidas importantes en la acumulación de la biomasa y producción de sacarosa. Además, es requerido por parte de los productores cañeros, nuevas herramientas con las cuales estimular de una manera natural, el crecimiento del cultivo. en el cultivo.

Por tal motivo, se pretende en primera instancia, desarrollar un procedimiento eficaz y económico para producir masivamente al hongo y poder ponerlo a disposición de los usuarios bajo diferentes formulaciones, dependiendo de las necesidades específicas.

EXPERIMENTO 1. Evaluación de 8 aislamientos y tres sustratos.

Objetivo principal.

Seleccionar un aislamiento y un sustrato altamente productivo para producir altas concentraciones del hongo.

Metodología.

Se seleccionaron 8 aislamientos del hongo *Trichoderma* spp de la colección del laboratorio que se encuentran a -80°C dentro de viales con un líquido criopreservante. Los aislamientos se crecieron en medio SDA. Todos los aislamientos respondieron positivamente a la reactivación. Bajo condiciones de asepsia, 2 cuadros de aproximadamente 2 cm^2 de cada aislamiento, fue inoculado en matraces de 250 ml de capacidad conteniendo medio SLM. Los matraces se sometieron a agitación orbital por espacio de 4 días a 150 RPM bajo un rango de temperatura de 24 a 26°C . La biomasa resultante fue inoculada en los tres tipos de sustratos que combinaron uno o dos fuentes de biomasa (AR y/o BA) y a todos se les aplicó AG. Se inocularon 3 bolsas de polipropileno conteniendo los sustratos previamente esterilizados en autoclave por 25 minutos a 121°C . Luego de 7 días de incubación en estantes dentro de una sala acondicionada a 26°C , se procedió a tomar una única muestra compuesta por aislamiento y sustrato y se analizó su concentración, viabilidad (%) y pureza microbiológica (%). La Figura 56 muestra el procedimiento empleado.

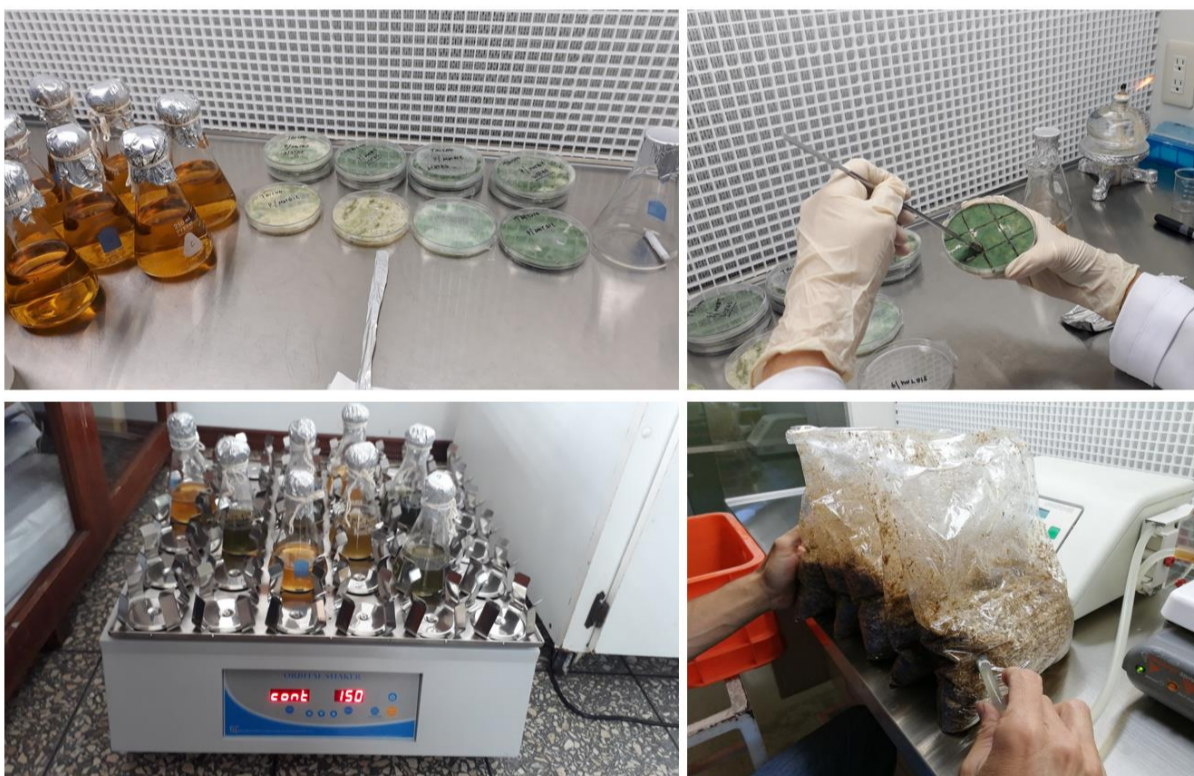


FIGURA 56.

Reproducción de 8 aislamientos de *Trichoderma* spp en tres diferentes sustratos.

Resultados.

En términos generales la viabilidad fluctuó entre el 70% y 98%, algo considerado como normal para este sistema de producción que normalmente aporta porcentaje de viabilidad altos; sin embargo, se presentaron serios problemas de germinación para dos de los aislamientos sometidos al sustrato BA + AG (#44 y #48) y uno sometido al sustrato AR + BA + AG (#55), lo cual fue debido a la presencia de una fuerte contaminación por bacterias no identificadas. Por esta misma razón, la mayoría de los aislamientos produjeron material biológico 100% puro, con excepción a los tratamientos indicados.

En cuanto a la concentración, diferentes aislamientos respondieron de diferente manera según el sustrato en el cual se crecieron; por ejemplo, utilizando el sustrato AR + BA + AG, el aislamiento INA-0519-TRASP (#57) reportó la más alta concentración de conidios, muy por encima del resto de aislamientos ($8,2 \times 10^9$ conidios/g). El aislamiento D 0519-TR-SUE (#46) fue el que alcanzó la más alta concentración utilizando el sustrato AR + AG; mientras que los aislamientos D 0119-TR-SUE (#44) y D 0619-TR-SUE (#47) obtuvieron la más alta concentración con el sustrato BA + AG que fue de $1,4 \times 10^9$ conidios/g. En general el sustrato AR + AG permitió que los aislamientos produjeran la mayor concentración de conidios, seguido por AR + BA + AG y por BA + AG (Cuadro 40 y Figuras 57, 58 y 59).

Los resultados obtenidos marcan el camino a seguir con los aislamientos y tipos de sustratos más eficaces para producir alta concentración de conidios del hongo, a un costo más bajo.

CUADRO 40.
Concentración (conidios/g) según aislamiento y sustrato utilizado.

CANTÓN / CULTIVO	CÓDIGO	SubSTRATO		
		AR + BA	AR	BA
Donación / INA ¹	INA-0519-TRHAR (#55)	6,50E+08	6,70E+09	1,20E+09
Grecia / café	D 0119-TR-SUE (#44)	1,30E+09	7,50E+08	1,40E+09
Los Chiles / caña azúcar	D 0319-TR-SUE1 (#48)	2,30E+09	3,80E+09	1,50E+08
Guápiles / banano	D 0719-TR-SUE (#43)	1,30E+09	3,80E+09	1,20E+09
Donación INA ²	INA-0519-TRASP (#57)	8,20E+09	7,80E+09	4,00E+08
Donación INA ³	INA-0519-TRHAM (#51)	2,10E+09	3,30E+09	7,00E+08
Jiménez / caña azúcar	D 0519-TR-SUE (#46)	1,60E+09	1,60E+10	3,50E+08
Montes de Oro / caña azúcar	D 0619-TR-SUE (#47)	1,20E+09	1,30E+10	1,40E+09

1/ *Trichoderma harzianum*; 2/ *Trichoderma asperellum*; 3/ *Trichoderma hamatum*. El resto identificadas como *Trichoderma sp.*

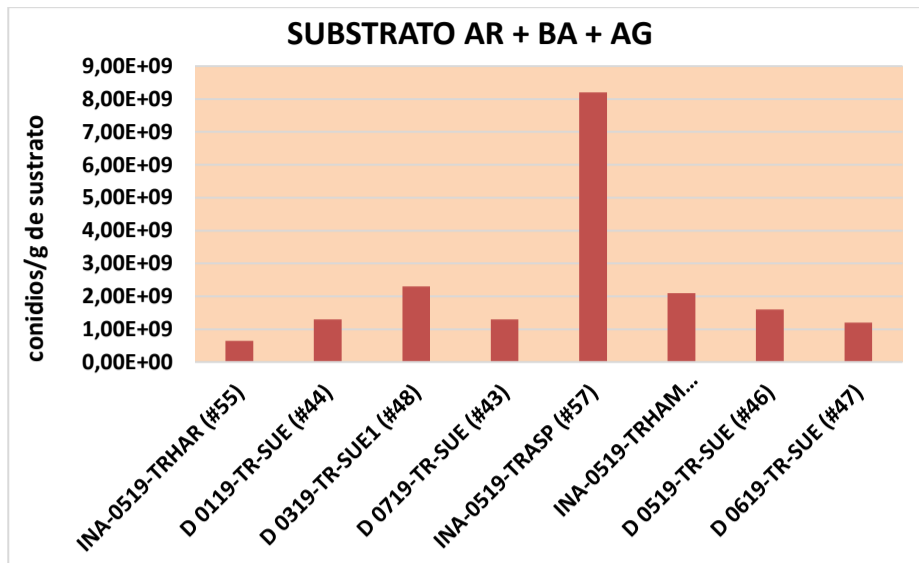


FIGURA 57.
Concentración (conidios/g) según aislamiento de *Trichoderma* spp para el sustrato AR + BA + AG.

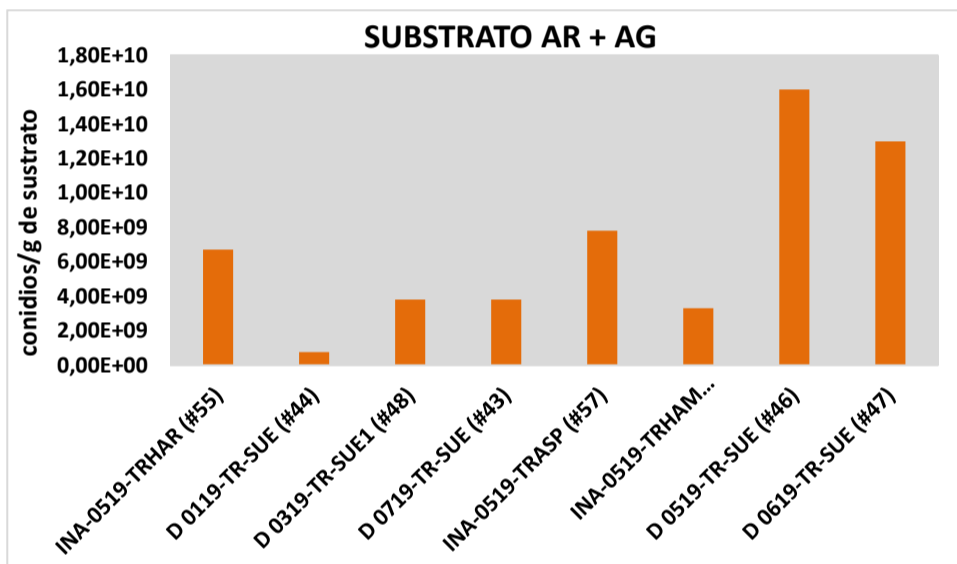


FIGURA 58.
Concentración (conidios/g) según aislamiento de *Trichoderma* spp para el sustrato AR + AG.

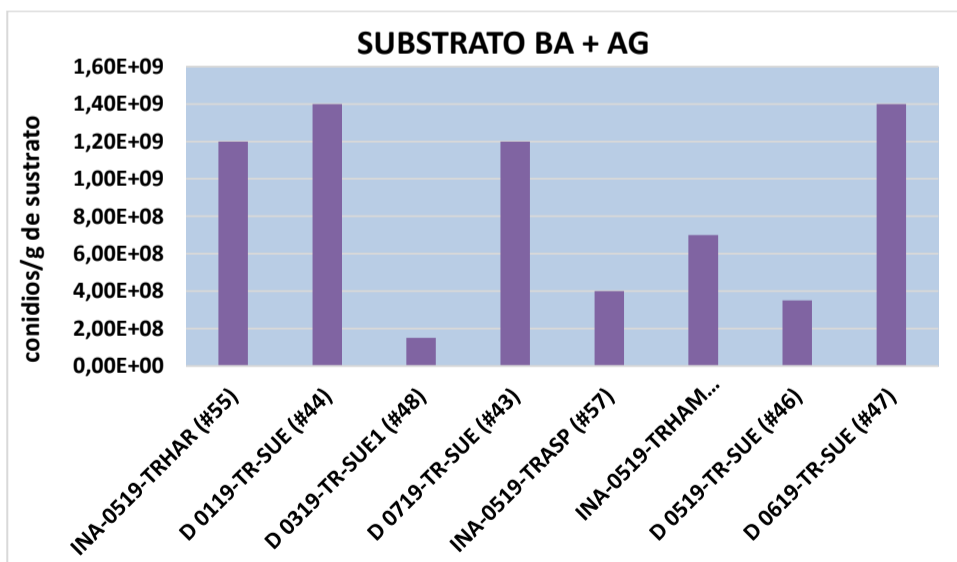


FIGURA 59.
Concentración (conidios/g) según aislamiento de *Trichoderma* spp para el sustrato BA + AG.

EXPERIMENTO 2. Evaluación de diferentes proporciones de componentes biomásicos para la reproducción masiva del hongo *Trichoderma* sp (D 0719-Tr-SUE4-#35).

Objetivo principal.

Desarrollar un substrato económico y altamente eficaz para reproducir masivamente al hongo *Trichoderma* spp, alcanzando altos niveles de pureza, concentración y viabilidad.

Objetivos específicos.

- Evaluar diferentes proporciones de materiales orgánicos como substrato básico para el hongo.
- Cuantificar en cada caso, los niveles de concentración, pureza y viabilidad para seleccionar las mejores mezclas.

Metodología.

El aislamiento seleccionado para este estudio fue *Trichoderma* sp (D 0719-Tr-SUE4-#35). En primera instancia una alícuota de 10 µL del criotubo donde se conserva el aislamiento a -80°C fue inoculada en placas Petri con medio SDA para su reactivación. Los cultivos se incubaron por 24 horas a 26°C; al cumplir ese período se eliminó el sello de la placa para oxigenar al hongo y se continuó con su incubación por 120 horas hasta su completa esporulación.

A partir de los cultivos se preparó una matriz de 250 ml del medio de cultivo SLM + YE y se esterilizó por 15 minutos en un matraz de 500 ml a 121°C. Posteriormente, bajo condiciones de asepsia, se inocularon dos trozos del cultivo de *Trichoderma* sp de aproximadamente 2 cm² cada uno y el matraz se mantuvo en agitación orbital a 150 RPM por 4 días. Posteriormente se inocularon 20 ml del cultivo líquido de *Trichoderma* sp en bolsas de polipropileno conteniendo las mezclas de los elementos de acuerdo a cada tratamiento según se indica en el Cuadro 41. Se utilizaron 10 repeticiones por cada tratamiento.

**CUADRO 41.
Tratamientos y su composición.**

TRATAMIENTO N°	AR (g)	BA (g)	AG (ml)
1	350	50	100
2	250	75	100
3	150	100	100
4	350	50	80
5	250	75	80
6	150	100	80
7	0	100	100
8	0	100	80
9	350	0	100
10	350	0	80

Luego de la inoculación las bolsas con los sustratos fueron homogenizadas y colocadas en estantes en posición horizontal; la temperatura de incubación fue de $26 \pm 2^\circ\text{C}$. A las 24 horas de haber inoculado el hongo, se procedió a realizar un pequeño corte en una esquina de cada bolsa para favorecer el ingreso de oxígeno. La incubación en esas condiciones se prolongó por 120 horas, hasta que la colonización y esporulación del hongo fueron totales.

Variables evaluadas.

A partir de cada tratamiento se tomó una muestra compuesta por 3 submuestras provenientes de 3 bolsas pertenecientes a cada tratamiento. La submuestra fue colocada y rotulada en un frasco tipo Gerber. Se determinó la concentración (conidios/g), la viabilidad (%) y la pureza (%).

Análisis de los datos.

Se utilizó el software estadístico INFOSTAT versión libre. Para determinar si se presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos, se aplicó una ANDEVA; al encontrarlos, se aplicó la prueba de separación de medias de LDS al 0,05% de significancia.

La Figura 60 muestra el procedimiento utilizado para la reproducción de *Trichoderma* sp (D 0719-Tr-SUE4-#35).



FIGURA 60.
Procedimiento empleado para evaluar diferentes sustratos para la producción de *Trichoderma* sp (D 0719-Tr-SUE4-#35).

Resultados

El análisis de varianza determinó diferencias estadísticas entre los tratamientos ($p=0,0001$). La prueba LSD indicó que los tratamientos T3, T5 y T2 alcanzaron la mayor concentración de conidios del hongo por gramo de substrato utilizado; no obstante, únicamente los dos primeros, difirieron estadísticamente del resto de tratamientos. El tratamiento T3 fue el único que permitió alcanzar concentraciones sobre 10^9 conidios/g, lo cual es un aspecto importante en la producción y rentabilidad de este tipo de insumos (Cuadro 42). Es importante indicar que el tratamiento T6 se perdió por contaminación con una bacteria no identificada.

En cuanto a la pureza (%) y viabilidad (%) de los tratamientos, no se encontró diferencias entre los tratamientos, obteniendo en todos los casos porcentajes fluctuando entre el 98 y 100%.

CUADRO 42.
Análisis de variancia y prueba de separación de medias.

Análisis de Varianza

VARIABLE	N	R2	R2 AJUST.	C.V.
conidios/g	78	0,84	0,82	26,67

Cuadro de Análisis de Varianza (SC Tipo III)

F.V.	S.C.	g.l.	C.M.	F	p-valor
Modelo	7,56E+18	8	9,4438E+17	45,05	0,0001
TRATAMIENTO	7,56E+18	8	9,4438E+17	45,05	0,0001
Error	1,45E+18	69	2,0961E+16		
Total	9,00E+18	77			

Test: Tuckey Alfa=0,05 DMS=223655396,50301

Error22960953814412160,0000 gl : 69

COMPOSICIÓN	MEDIAS (CONIDIOS/g)	N	E.E.	SEPARACIÓN				
T8 (AR 0, B 100, AG 80)	1,92E+08	8	5,12E+07	A				
T10 (AR 350, B 0, AG 80)	2,35E+08	10	4,58E+07	A				
T7 (AR 0, B 100, AG 100)	2,36E+08	8	5,12E+07	A				
T9 (AR 350, B 0, AG 100)	3,20E+08	10	4,58E+07	A	B			
T4 (AR 350, B 50, AG 80)	5,24E+08	9	4,83E+07		B	C		
T1 (AR 350, B 50, AG 100)	6,14E+08	8	5,12E+07			C	D	
T2 (AR 250, B 75, AG 100)	8,28E+08	8	5,12E+07				D	E
T5 (AR 250, B 75, AG 80)	9,93E+08	9	4,83E+07					E
T3 (AR 150, B 100, AG 100)	1,02E+09	8	5,12E+07					E

* Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p>0,05$).

5.2. Evaluación de la patogenicidad de hongos entomopatógenos como agentes de control de jobotos, *Phyllophaga* spp., bajo condiciones de vivero con plantas de maíz (*Zea mays*). (A. Rodríguez Morales, JD. Salazar Blanco, E. Cadet Piedra).

Phyllophaga spp, en su estado larval conocido como “joboto” o “chogoto”, es una plaga de gran importancia económica en el cultivo de la caña de azúcar, no solo por las pérdidas en tonelaje que genera al dañar el sistema radical de la planta, sino por el costo del control que incluye el trampeo masivo de “abejones de mayo”, la roturación del suelo para exponer larvas a depredadores naturales y el uso de insecticidas de alta toxicidad. Si bien es frecuente encontrar larvas parasitadas naturalmente con los hongos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, las aplicaciones comerciales con estos entomopatógenos, ejercen un control modesto e insuficiente.

Por tal motivo, es necesario desarrollar un sistema robusto que permita la identificación de cepas de alta virulencia y formulaciones adecuadas a las necesidades. En este estudio, que forma parte de un proceso tendiente a perfeccionar el protocolo de selección de aislamientos nativos extraídos de diferentes regiones cañeras afectadas por la plaga, se evaluaron 4 candidatos correspondientes al hongo *Metarhizium anisopliae* y 4 al hongo *Beauveria bassiana*; de éstas, un aislamiento de cada hongo, se reproducen a nivel masivo para el control de otras plagas del cultivo (D 0317 Ma y D 0117 Bb), respectivamente).

Se incluyó dentro de este ensayo, el uso de un humectante para homogenizar la suspensión de los hongos (WK) y un penetrante (PENETREX) para mejorar la penetración de las conidias en el perfil del suelo, buscando que éstas alcancen a las larvas del insecto. Asimismo, en este experimento se incluyeron los controles necesarios para dilucidar si estos coadyuvantes por sí mismos, ejercen algún nivel de control sobre el insecto. Previo a este estudio se realizaron pruebas de laboratorio para determinar la compatibilidad entre los hongos y los coadyuvantes, resultando estos aptos para ser utilizados experimental y comercialmente en aplicaciones de estos hongos.

Objetivos.

1. Determinar el efecto de la aplicación de 4 aislamientos de *Metarhizium anisopliae* y 4 de *Beauveria bassiana*, sobre larvas de *Phyllophaga* sp de tercer estadio larval (L3), bajo condiciones de invernadero utilizando plantas de maíz en vasos de plástico #16.
2. Estudiar el efecto exclusivo del humectante WK al 0.05% y el penetrante PENETREX al 0.01% sobre los jobotos.

Metodología

Se llenaron vasos de plástico desechable N°16 con suelo previamente homogenizado y se sembraron dos semillas de maíz (híbrido HR-960, Biosemillas) en cada vaso. Luego de 15 días de haber germinado, se aplicó una fórmula completa de fertilizante a razón de 1,0 g por vaso. Luego de 8 días de haber fertilizado, se colocaron 2 jobotos por vaso para un total de 100 vasos. Los jobotos utilizados fueron recolectados en campo y seleccionados para el experimento por su vitalidad, apariencia general y estadio (L3). Luego de 8 días de adaptación de los jobotos, se aplicaron los tratamientos a razón de 5 ml de una suspensión conidial por vaso, tal como se observa en la Figura 61. El Cuadro 43 muestra los tratamientos utilizados.



FIGURA 61
Suspensión estandarizada de conidios y aplicación de tratamientos.

CUADRO 43.
Tratamientos con aislamientos nativos de hongos entomopatógenos.

TRATAMIENTO	COMPOSICIÓN
Tratamiento 1	WK, Penetrex y cepa D 0219-Ma-SUE1
Tratamiento 2	WK, Penetrex y cepa D 0219-Ma-SUE
Tratamiento 3	WK, Penetrex y cepa D 0319-Bb-SUE
Tratamiento 4	WK, Penetrex y cepa D 0619-Ma-SUE
Tratamiento 5	WK, Penetrex y cepa D 0319-Bb-SUE3
Tratamiento 6	WK, Penetrex y cepa D 0119-Bb-SUE2
Tratamiento 7	WK, Penetrex y cepa D 0317 Ma
Tratamiento 8	WK, Penetrex y cepa D 0117 Bb
Trat. 9 (Test. Abs.)	Sin hongos
Trat. 10 (Test. Relativo)	WK y Penetrex

La preparación de los tratamientos correspondientes a las diferentes mezclas entre los hongos y los coadyuvantes, se realizó de la siguiente manera: bajo condiciones de asepsia, se agregó dentro de matraces de 250 ml de capacidad, una solución estéril de 100 ml de agua de tubo (agua potable) conteniendo el humectante WK (0.05%) y el penetrante PENETREX (0.01%).

A continuación, se agregó dos trozos de colonias desarrolladas del hongo de 2 cm² a cada matraz y este se agitó manualmente hasta homogenizar la suspensión de conidios; a esta suspensión se le denominó suspensión madre (SM). Una vez homogenizada la SM, se procedió a realizar una dilución seriada hasta 10⁻³ y se cuantificó el número de conidios en dos sub-cámaras utilizando una cámara de conteo (Neu Bauer) de 0,1 mm de profundidad y 0,0025 mm² de área de cuadrante.

Una vez cuantificados los conidios promedio presentes en la dilución indicada, se calculó el volumen de SM necesario para estandarizar a una concentración de 2,0 X 10⁷ conidios/ml, lo que correspondería a una dosificación de 6 kg de hongo con arroz/ha, aplicado en un volumen total de 600 L. A continuación se aplicó 5 ml de cada suspensión estandarizada por cada vaso. La unidad experimental estuvo conformada por un vaso con suelo sin tratar, una planta de maíz de 30 días de germinada y dos jobotos.

La distribución de los tratamientos se realizó siguiendo el criterio de aleatorización completa. Cada tratamiento, incluyendo a los dos testigos contempló 10 repeticiones.

Variables de medición.

La evaluación del experimento se realizó 15 días después de aplicar los tratamientos. La variable de medición fue la condición de los jobotos; es decir, si estaban vivos o muertos. Los insectos muertos fueron analizados para describir la presencia o ausencia de signos de infección típicos por los hongos aplicados; además, aquellos que no presentaron signos fueron introducidos en cámaras húmedas para identificar si estaban o no infectados.

Análisis de los datos.

Para este análisis se utilizó la versión libre del software estadístico INFOSTAT, aplicando un Análisis de Varianza (ANDEVA) no paramétrico mediante la prueba de Kruskal Wallis debido al reducido número de muestras. Al no encontrarse diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, no fue necesario aplicar otras pruebas.

Resultados.

Como se indicó, el ANDEVA no declaró la existencia de diferencias estadísticas entre los tratamientos con los diferentes aislamientos, ni entre éstos y los testigos utilizados ($p=0,3053$) (Cuadro 44).

CUADRO 44.
Análisis de Varianza no paramétrico (Kruskal Wallis).

Prueba de Kruskal Wallis						
Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Medianas	H p
MORTALIDAD TOTAL	T1	10	0,10	0,32	0,00	3,83 0,3053
MORTALIDAD TOTAL	T10	10	0,10	0,32	0,00	
MORTALIDAD TOTAL	T2	10	0,00	0,00	0,00	
MORTALIDAD TOTAL	T3	10	0,20	0,42	0,00	
MORTALIDAD TOTAL	T4	10	0,10	0,32	0,00	
MORTALIDAD TOTAL	T5	10	0,20	0,42	0,00	
MORTALIDAD TOTAL	T6	10	0,00	0,00	0,00	
MORTALIDAD TOTAL	T7	10	0,10	0,32	0,00	
MORTALIDAD TOTAL	T8	10	0,50	0,71	0,00	
MORTALIDAD TOTAL	T9	10	0,20	0,42	0,00	

De acuerdo al Cuadro 45 y la Figura 62, los tratamientos con mayores niveles de mortalidad sobre el insecto, coincidentemente correspondieron a los aislamientos que se reproducen comercialmente, D 0317 Ma (28,57%) y D 0117 Bb (26,32%). No obstante, como se indicó, éstos no arrojaron diferencias estadísticas entre sí o respecto a los demás tratamientos y testigos, lo cual pudo haberse debido a la reducida cantidad de datos y a su variabilidad. Tampoco fue posible achacar algún nivel de mortalidad debida propiamente a los coadyuvantes, por lo que se pueden declarar como inocuos al insecto y por tanto, aptos para realizar este tipo de estudios.

CUADRO 45.
Mortalidad (%) de jobotos según tratamiento y testigo.

TRATAMIENTO N°	COMPOSICIÓN	VIVOS	MUERTOS	MORTALIDAD (%)
T1	D 0219-MA-SUE1	19	1	5,00
T2	D 0219-MA-SUE	17	0	0,00
T3	D 0319-Bb-SUE	19	2	9,52
T4	D 0619-Ma-SUE	17	1	5,56
T5	D 0319-Bb-SUE3	18	2	10,00
T6	D 0119-Bb-SUE2	19	0	0,00
T7	D 0317 Ma	15	6	28,57
T8	D 0117 Bb	14	5	26,32
TEST. ABS.	SOLO JOBOTOS	14	2	12,50
TEST. ADITIVOS	WK + PENETREX	18	1	5,26

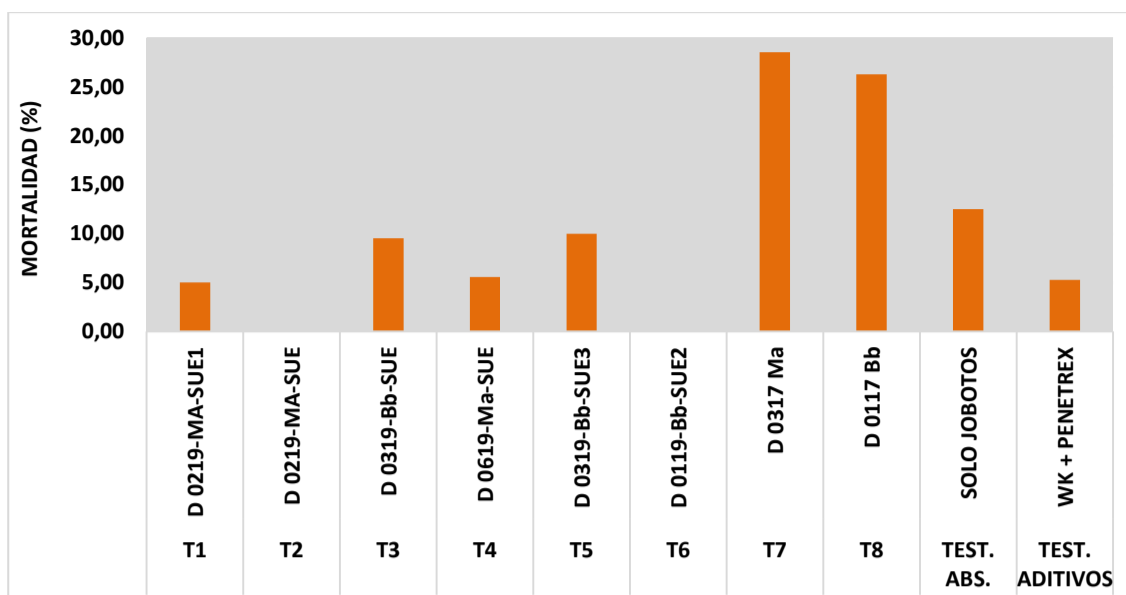


FIGURA 62.
Mortalidad (%) de jobotos según tratamiento.

5.3. COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS (Alejandro Rodríguez Morales, Ana Isabel Alpizar Alfaro).

Como se ha mencionado anteriormente, contar con una colección de microorganismos diversa tanto por la naturaleza de sus componentes, como por su distribución geográfica, es vital para desarrollar innovadores insumos biológicos o biorracionales, acorde con las necesidades productivas actuales y las demandas de los mercados. Esta labor es continua en tres aspectos principales: adquisición de nuevas obtenciones microbianas enfocadas en nuevos retos de sostenibilidad de producción de cultivos, mantenimiento de la colección y proceso de selección en busca de candidatos de alto potencial.

Con ese objetivo, desde el año 2018 se trabaja en el fortalecimiento de la colección de microorganismos, incrementando la disponibilidad de agentes tradicionales con efecto regulatorio de artrópodos (insectos y ácaros), pero además, considerando la obtención de otros grupos de microorganismos funcionales con efecto promotor de crecimiento vegetal (biofertilizante – bioestimulante), como lo son las bacterias fijadoras de nitrógeno, los hongos y bacterias que solubilizan elementos químicos (P, K, S), los inductores de resistencia sistémica y los sideróforos, entre otros. Otros grupos de interés para desarrollar insumos biotecnológicos, son los biodegradantes de materia orgánica y de sustancias tóxicas presentes en el suelo y el agua comúnmente llamados biorremediantes.

Para el 2019 la colección alcanzó las 199 obtenciones microbianas que abarcan un número importante de géneros y especies como *Beauveria bassiana*, *Bacillus* sp, *Metarhizium anisopliae*, *Trichoderma* spp, *Lactobacillus* sp y *Lecanicillium lecanii*. El cuadro 46 muestra la cantidad de aislamientos coleccionados según género y especies.

De acuerdo al cultivo del cual fueron aislados, 81 obtenciones corresponden a microorganismos aislados de la rizósfera o tejido de plantas de caña de azúcar (40,7%), 53 del cultivo de banano (26,6%), 12 de pasturas (6,0%) y otros cultivos como hortalizas, café, plantas ornamentales, cítricos, fresas y maíz. Además, 6 obtenciones fueron aisladas de muestras de suero de leche, correspondiendo esto a *Lactobacillus* sp (Cuadro 47).

De acuerdo a la provincia y cantón de origen, 90 aislamientos provienen de la provincia de Alajuela (45,2%), de los cuales 42 son del cantón de Grecia (21,1%), 23 de San Carlos (11,6%), 19 de San Ramón (9,5%), 4 de Poás (2,0%) y 2 de Los Chiles (1,0%). En segundo lugar de acuerdo al origen, la provincia de Limón, cantón de Guápiles ha facilitado un total de 67 aislamientos, correspondiendo esto al 33,7% del total; en tercer lugar, la provincia de Puntarenas, cantón de Montes de Oro ha sido el origen de 13 aislamientos (6,5%). En la provincia de Guanacaste se ha aislado un total de 11 microorganismos (5,5%), distribuyéndose entre los cantones de Cañas, La Cruz y Liberia con 6, 4 y 1 aislamientos, correspondiendo al 3,0%, 2,0% y 0,5%, respectivamente. En la provincia de Cartago se ha obtenido un total de 9 aislamientos (4,5%), 8 del cantón de Oreamuno (4,0%) y uno del cantón de Jiménez (1,0%). Los restantes 9 aislamientos (4,5%) no tienen un origen claramente definido (Cuadro 48).

CUADRO 46.
Estado actual de la colección de microorganismos funcionales
en cuanto a género y especie.

MICROORGANISMO	N° AISLAMIENTOS	%	USO
<i>Beauveria bassiana</i>	76	38,2	CB de insectos y ácaros
<i>Bacillus sp</i>	35	17,6	Biofertilizante, bioestimulante, biorremediante, CB insectos, nematodos y patógenos
<i>Metarhizium anisopliae</i>	28	14,1	CB de insectos y ácaros
<i>Trichoderma sp</i>	11	5,5	Biofertilizante, bioestimulante, biodegradación, CB patógenos
<i>Lactobacillus sp</i>	10	5,0	Bioestimulante, biodegradante, CB patógenos
<i>Lecanicillium lecanii</i>	4	2,0	CB de insectos
<i>Arthrobotrys sp</i>	1	0,5	CB nematodos
<i>Aspergillus parasiticus</i>	1	0,5	CB insectos
<i>Dactylaria sp</i>	1	0,5	CB nematodos
<i>Isaria sp</i>	1	0,5	CB insectos
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	1	0,5	CB nematodos e insectos
<i>Penicillium sp</i>	1	0,5	no determinado
<i>Trichoderma asperellum</i>	1	0,5	Biofertilizante, bioestimulante, biodegradación, CB patógenos
<i>Trichoderma hamatum</i>	1	0,5	Biofertilizante, bioestimulante, biodegradación, CB patógenos
<i>Trichoderma harzianum</i>	1	0,5	Biofertilizante, bioestimulante, biodegradación, CB patógenos
<i>Trichoderma koningii</i>	1	0,5	Biofertilizante, bioestimulante, biodegradación, CB patógenos
No identificado	25	12,6	-
TOTAL	199	100	-

CUADRO 47.
Estado actual de la colección de microorganismos funcionales
en cuanto a cultivo del cual fueron aislados.

CULTIVO	N° AISLAMIENTOS	%
Caña de azúcar	81	40,7
Banano	53	26,6
Pasto	12	6,0
Suero de leche	10	5,0
Bosque	6	3,0
Lechuga	5	2,5
Café	4	2,0
Helecho	4	2,0
Naranja	4	2,0
Otros	4	2,0
C. de azúcar orgánica	1	0,5
Chile dulce	1	0,5
Lab. Cultivo Tejidos	1	0,5
Fresa	1	0,5
Maíz	1	0,5
No Indicado	11	5,5
TOTAL	199	100

CUADRO 48.
Cantidad de aislamientos según Provincia y cantón.

PROVINCIA	CANTÓN	N° AISLAMIENTOS	%
Alajuela	Grecia	42	21,1
	San Carlos	23	11,6
	San Ramón	19	9,5
	Poás	4	2,0
	Los Chiles	2	1,0
SUBTOTAL		90	45,2
Limón	Guápiles	67	33,7
SUBTOTAL		67	33,7
Puntarenas	Montes de Oro	13	6,5
SUBTOTAL		13	6,5
Guanacaste	Cañas	6	3,0
	La Cruz	4	2,0
	Liberia	1	0,5
SUBTOTAL		11	5,5
Cartago	Oreamuno	8	4,0
	Jimenez	1	0,5
SUBTOTAL		9	4,5
Desconocido	-	9	4,5
SUBTOTAL		9	4,5
TOTAL		199	100

6. INVESTIGACIÓN DIRIGIDA HACIA EL DESARROLLO DE INSUMOS BIOLÓGICOS BIOFERTILIZANTES Y DE TECNOLOGÍAS PARA EL MEJORAMIENTO DE LA SALUD DEL SUELO CAÑERO.

6.1. Selección de hongos y bacterias promotoras de crecimiento vegetal a nivel de vivero, para el desarrollo de bioestimulantes en la producción sostenible de la caña de azúcar (Alejandro Rodríguez Morales, Javier Bolaños Porras, Ana Isabel Alpizar Alfaro).

La agricultura moderna exige el desarrollo de nuevas tecnologías que reviertan los procesos degenerativos del suelo producto de décadas de una agricultura agresiva y altamente dependiente de los agroquímicos. Un suelo saludable es aquel cuyas características físicas, químicas y microbiológicas están en balance y son las adecuadas para producir cultivos agrícolas con una mínima dependencia de sustancias sintéticas como plaguicidas y fertilizantes. Este proceso debe de ser integral, buscando mejorar los niveles de carbono orgánico como base principal para la reactivación de los procesos biogeológicos que favorecen la nutrición y defensa de las plantas ante los patógenos y factores de clima.

Una de las alternativas más estudiadas y a las que se le exhibe con mayor potencial para reducir la dependencia en el uso de agroquímicos, es el uso de biofertilizantes a base de microorganismos que promueven el crecimiento vegetal a través de múltiples mecanismos, como la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de elementos químicos, producción de fitohormonas, inducción de resistencia sistémica, producción de sideróforos y control biológico, entre otros.

Se explica a continuación los avances en el desarrollo de agentes biológicos con efecto biofertilizante a partir de microorganismos obtenidos de diferentes regiones en donde se cultiva la caña de azúcar.

Metodología.

El proceso de investigación inició con la obtención de los aislamientos a partir de muestras de suelo rizosférico y de raíz de la caña provenientes de diferentes regiones cañaras del país. Para ello se utilizaron técnicas microbiológicas y medios de cultivo para favorecer el crecimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno, solubilizadores de fósforo y se aplicó la pasteurización de la muestra para obtener bacterias esporuladas asociadas al género *Bacillus*

Las bacterias seleccionadas para los experimentos fueron crecidas en un medio líquido general para estos microorganismos (Broth Nutrient Agar Oxoid); este proceso requirió de agitación e incubación a 130 RPM y 28-30°C por 48 horas. Luego de este período los cultivos estuvieron listos para inocular el material vegetal. En este primer experimento se aplicaron dos tipos de inoculación: inmersión de yemas (I) en la suspensión bacteriana por espacio de 60 minutos y una segunda aplicación de las bacterias en forma de drench (D), a razón de 5 ml por cada vitroplanta. Con base a lo anterior, se establecieron dos variantes

de tratamientos por cada cepa bacteriana utilizada: uno con inoculación de yemas por inmersión más una aplicación vía drench ((I+D), y otro con únicamente la aplicación de las bacterias por drench (D).

Las yemas inoculadas y sin inocular fueron sembradas en bandejas con sustrato de siembra compuesto por suelo (40%), abono orgánico (35%), arena roja volcánica (15%) y lodo (5%) (carbón activado + diatomita) en base peso/peso. Se utilizó una bandeja por cada bacteria o tratamiento; la mitad (10 hoyos) correspondió a tratamiento de inmersión + drench (I+D) y la otra mitad (10 hoyos) solo en drench (D). El drench se aplicó luego de 15 días de la siembra una vez aparecieran raíces verdaderas. Las plantas se mantuvieron en las bandejas por espacio de 70 días, período durante el cual se fueron fertilizadas una única vez con la mitad de la dosis de una fórmula completa.

Se establecieron tres controles: un control al cual se le aplicó el medio de cultivo sin bacteria, otro sin aplicación de fertilizante y un tercero con la dosis completa del fertilizante, pero sin bacterias. La Figura 63 detalla el procedimiento de producción de los inóculos bacterianos y la aplicación de los tratamientos por inmersión (I) y drench (D); el Cuadro 49 muestra los tratamientos y controles utilizados.

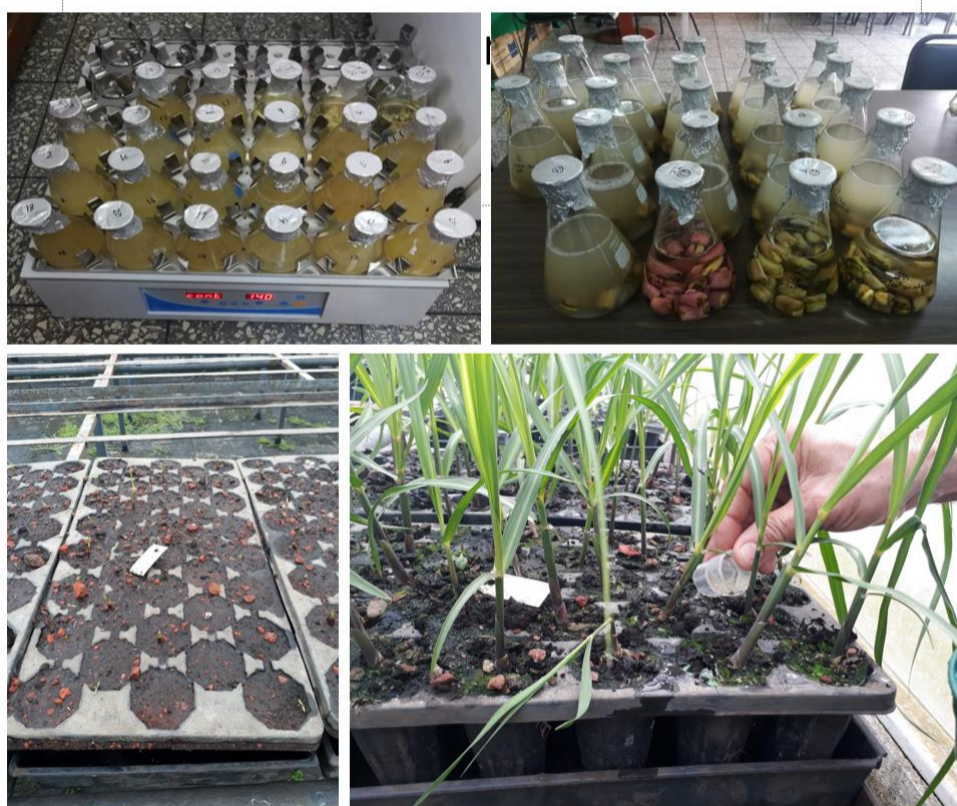


FIGURA 63.
Producción del inóculo bacteriano y la aplicación de los tratamientos.

CUADRO 49.
Tratamientos empleados en el experimento.

TRATAMIENTO N°	CÓDIGO CEPA	CANTÓN DE ORIGEN	ORIGEN DEL AISLAMIENTO	MICROORG.	CULTIVO	REGIMEN DE FERTILIZACIÓN (%)
1	RAÍZ/SUELO TAB 16	Cañas	Rizósfera	bacteria NI	caña de azúcar	50
2	RAÍZ/SUELO TAB 12	Cañas	Rizósfera	bacteria NI	caña de azúcar	50
3	D 0219-BAC 26 #61	Cañas	Rizósfera	<i>Bacillus</i> sp	caña de azúcar	50
4	D 0219-BAC 39 #80	Cañas	Rizósfera	<i>Bacillus</i> sp	caña de azúcar	50
5	D 0719-BFN2 34 #34	Guápiles	Endorizósfera	bacteria NI	caña de azúcar	50
6	BACT END OF #7	Guápiles	Endorizósfera	bacteria NI	Banano	50
7	D 0219-BAC 36 #77	Cañas	Rizósfera	<i>Bacillus</i> sp	caña de azúcar	50
8	BACT FCA S PEDR #63	Pérez Zeledón	Rizósfera	<i>Bacillus</i> sp	caña de azúcar	50
9	D 0119-LL-AF12 #5	Grecia	Áfido (<i>S. flava</i>)	<i>L. lecanii</i>	caña de azúcar	50
10	D 0219-BAC 32 #72	Cañas	Rizósfera	<i>Bacillus</i> sp	caña de azúcar	50
11	D 0219-BAC 31 #71	Cañas	Rizósfera	<i>Bacillus</i> sp	caña de azúcar	50
12	D 0219-BAC 29 #65	Cañas	Rizósfera	<i>Bacillus</i> sp	caña de azúcar	50
13	D 0119-BAC 01 #68	Grecia	Rizósfera	<i>Bacillus</i> sp	Café Sombra	50
14	FCA S PEDR BACT #76	Pérez Zeledón	ND	bacteria NI	caña de azúcar	50
15	D 0219-BAC 28 #64	Cañas	Rizósfera	<i>Bacillus</i> sp	Caña de azúcar	50
16	D 0719-BAC 9 #21	Guápiles	Rizósfera	<i>Bacillus</i> sp	Banano	50
17	D 0719-BAC 10 #23	Guápiles	Rizósfera	<i>Bacillus</i> sp	Banano	50
18	D 0719-BAC 4 #9	Guápiles	Rizósfera	<i>Bacillus</i> sp	Banano	50
19	D 0719-BAC 17 #64	Guápiles	Rizósfera	<i>Bacillus</i> sp	Banano	50
20	FCA CHON S PED #66	Pérez Zeledón	Rizósfera	<i>Bacillus</i> sp	caña de azúcar	50
21	TESTIGO CALDO					50
22	TESTIGO ABSOLUTO					0
23	TESTIGO COMERCIAL					100

Diseño experimental.

No se utilizó ningún diseño experimental, en defecto, cada bandeja constó de 10 plantas tratadas por inmersión de yemas más una aplicación en drench y 10 plantas tratadas solo mediante drench. Las bandejas se ubicaron dentro de un invernadero en donde recibieron el mismo manejo en cuanto a riego y fertilización según se indicó.

Variables de medición.

Al cumplir 70 días luego de la siembra, las plantas se extrajeron de las bandejas, se les lavó su sistema radical y se seccionó la parte aérea (tallo + hojas) de la raíz. Cada sección fue pesada en un balanza electrónica (peso fresco); posterior a esto el material vegetal se introdujo en bolsas de papel y se llevó a una estufa en donde se secó a 65°C por 48 horas hasta peso constante. A continuación se cuantificó entonces el peso fresco (PF) y peso seco (PS) de tallo + hojas y de raíz (Figura 64).



FIGURA 64.
Pesaje del material vegetal (peso fresco y seco de tallo + hojas y de raíz).

Análisis estadístico.

Se realizó un análisis de varianza para dilucidar si el tratamiento con plantas que fueron inoculadas a nivel de yema y drench (I+D), se diferenció del material al cual únicamente se le aplicó una vez la bacteria en forma de drench (D). Al no encontrar diferencias estadísticas, se realizó un nuevo análisis de varianza para determinar la existencia de diferencias entre tratamientos, esta vez, con un total de 20 repeticiones (plantas) por tratamiento. Posterior a esto se realizó una prueba de separación de medias mediante la prueba de Tuckey al 0,05% de significancia, con el objetivo de diferenciar a promedios para cada variable.

Resultados.

El análisis de 460 muestras de cada parte seccionada de la planta ya sea en cuanto a peso fresco (PF) como seco (PS), indicó que no hubo diferencias estadísticas significativas entre las dos variantes de inculación (n=10). Para la variable PF (T+H) el valor medio de fue de 17,6g para D y de 17,39g para I+D ($p=0,8488$); para PF (R) el valor promedio fue de 21,76g (I+D) y 22,53g (D) ($p=0,2277$); para la variable PS (T+H) los valores promedio fueron de

2,78g (I+D) y de 2,82g (I) ($p=0,7262$); y finalmente para la variable PS (R), los promedios fueron de 5,29g (I+D) y de 5,46g (I) ($p=0,4019$) (Cuadro 50).

Se concluyó con este primer análisis, que la inoculación de las yemas con las diferentes bacterias, no influyó finalmente en el crecimiento de la planta, lo cual posiblemente se debió a que las raíces que la yema emite para su anclaje, no emiten los polisacáridos y demás exudados que las bacterias necesitan para colonizar la rizósfera y producir sus beneficios, en este caso, un aumento en la biomasa de la planta.

Congruente con este resultado, se realizó un segundo análisis de varianza analizando las variables indicadas para cada bacteria para un total de 20 repeticiones por tratamiento ($n=20$). Como se puede observar en los Cuadros 51, 52, 53 y 54, y en las figuras el análisis de varianza sí declaró diferencias estadísticas para todas las variables estudiadas. Las figuras 65, 66, 67 y 68, muestran los valores promedio según variable incluyendo el Error Estándar. La Figura 69 muestra las dimensiones y características de los tratamientos seleccionados como los más promisorios en este experimento (1, 2, 14, 17 y 19).

CUADRO 50.

Análisis de la varianza para los dos tratamientos según tipo de inoculación (I+D) o (I).

PF (T+H)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PF (T+H)	460	7,9E-05	0,00	41,11

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,84	1	1,84	0,04	0,8488
TRATAMIENTO	1,84	1	1,84	0,04	0,8488
Error	23230,03	458	50,72		
Total	23231,87	459			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,30509

Error: 50,7206 gl: 458

TRATAMIENTO Medias n E.E.

D 17,26 230 0,47 A

I+D 17,39 230 0,47 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

PF (R)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PF (R)	460	3,2E-03	1,0E-03	30,90

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	68,32	1	68,32	1,46	0,2277
TRATAMIENTO	68,32	1	68,32	1,46	0,2277
Error	21449,57	458	46,83		
Total	21517,89	459			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,25408

Error: 46,8331 gl: 458

TRATAMIENTO Medias n E.E.

D 21,76 230 0,45 A

I+D 22,53 230 0,45 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

PS (T+H)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PS (T+H)	460	2,7E-04	0,00	43,68

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,18	1	0,18	0,12	0,7262
TRATAMIENTO	0,18	1	0,18	0,12	0,7262
Error	683,37	458	1,49		
Total	683,56	459			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,22384

Error: 1,4921 gl: 458

TRATAMIENTO Medias n E.E.

I+D 2,78 230 0,08 A

D 2,82 230 0,08 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

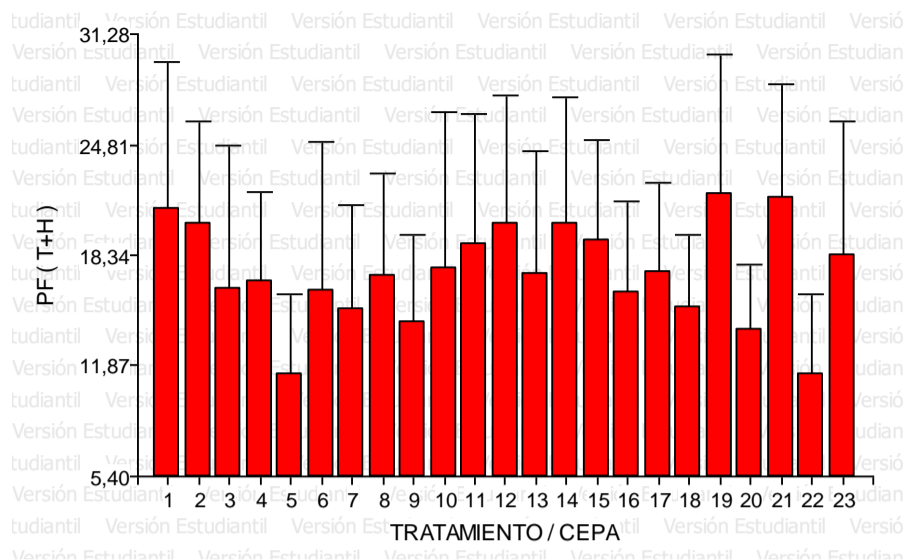


FIG. 65.
Promedio y desviación estándar para PF (T+H).

CUADRO 52.
Análisis de la varianza para la variable PF (R) según tratamiento (bacteria).

PF (R)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PF (R)	460	0,25	0,21	27,48

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5371,08	23	233,53	6,31	<0,0001
TRATAMIENTO	68,32	1	68,32	1,84	0,1751
CEPA	5302,76	22	241,03	6,51	<0,0001
Error	16146,81	436	37,03		
Total	21517,89	459			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,11534

Error: 37,0340 gl: 436

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.	
D	21,76	230	0,40	A
I+D	22,53	230	0,40	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=3,78230

Error: 37,0340 gl: 436

CEPA	Medias	n	E.E.	
11	16,43	20	1,36	A
16	17,21	20	1,36	A B
5	17,55	20	1,36	A B C
8	18,77	20	1,36	A B C D
6	18,85	20	1,36	A B C D
20	19,42	20	1,36	A B C D E
23	20,34	20	1,36	B C D E
15	20,49	20	1,36	B C D E
22	20,51	20	1,36	B C D E
9	20,88	20	1,36	B C D E
12	21,05	20	1,36	C D E
7	21,71	20	1,36	D E
18	22,24	20	1,36	D E F
13	22,26	20	1,36	D E F
10	22,49	20	1,36	D E F G
1	22,80	20	1,36	E F G
4	25,68	20	1,36	F G H
2	26,10	20	1,36	G H
19	26,26	20	1,36	G H
3	26,63	20	1,36	H
17	26,66	20	1,36	H
21	26,72	20	1,36	H
14	28,36	20	1,36	H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

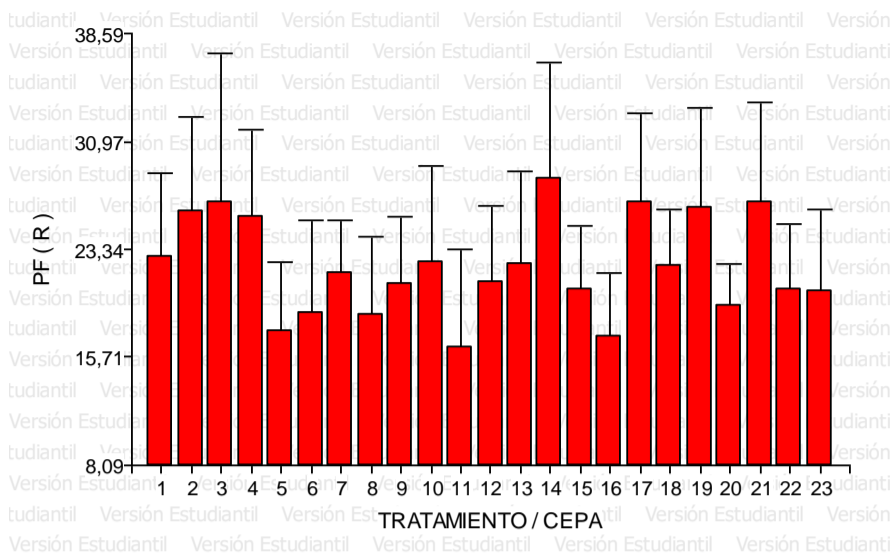


FIG. 66.
Promedio y desviación estándar para PF (R).

CUADRO 53.
Análisis de la varianza para la variable PS (T+H) según tratamiento (bacteria).

PS (T+H)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PS (T+H)	460	0,15	0,10	41,30

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	101,89	23	4,43	3,32	<0,0001
TRATAMIENTO	0,18	1	0,18	0,14	0,7111
CEPA	101,70	22	4,62	3,47	<0,0001
Error	581,67	436	1,33		
Total	683,56	459			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,21169

Error: 1,3341 gl: 436

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.
I+D	2,78	230	0,08 A
D	2,82	230	0,08 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,71788

Error: 1,3341 gl: 436

CEPA	Medias	n	E.E.
22	1,79	20	0,26 A
5	1,97	20	0,26 A B
20	2,10	20	0,26 A B C
7	2,33	20	0,26 A B C D
9	2,43	20	0,26 A B C D E
3	2,56	20	0,26 B C D E F
18	2,61	20	0,26 B C D E F
4	2,63	20	0,26 B C D E F G
6	2,66	20	0,26 B C D E F G
16	2,71	20	0,26 C D E F G H
11	2,73	20	0,26 C D E F G H
23	2,76	20	0,26 C D E F G H
13	2,79	20	0,26 C D E F G H I
8	2,85	20	0,26 D E F G H I
17	2,93	20	0,26 D E F G H I J
10	2,94	20	0,26 D E F G H I J
2	3,13	20	0,26 E F G H I J
1	3,28	20	0,26 F G H I J
21	3,34	20	0,26 G H I J
15	3,35	20	0,26 G H I J
12	3,38	20	0,26 H I J
14	3,48	20	0,26 I J
19	3,58	20	0,26 J

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

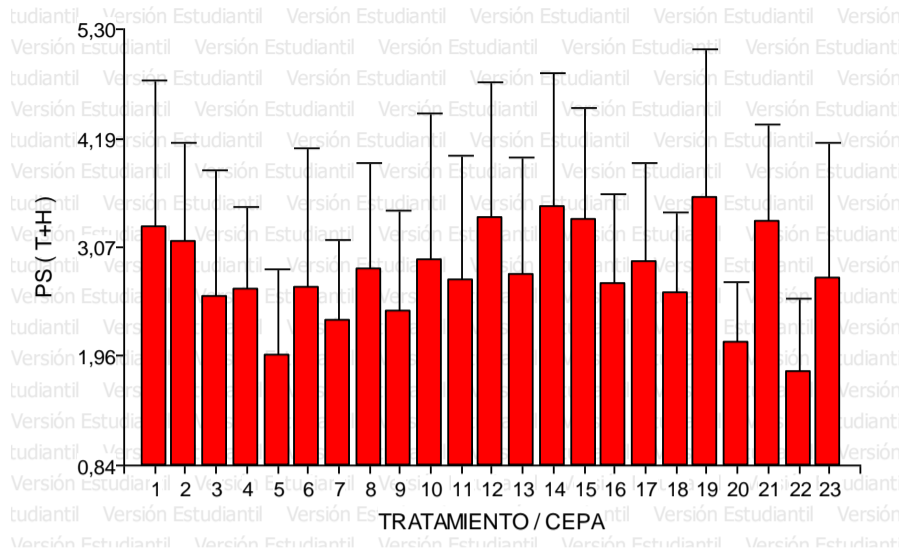


FIG. 67.
Promedio y desviación estándar para PS (T+H).

CUADRO 64.
Análisis de la varianza para la variable PS (R) según tratamiento (bacteria).

PS (R)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PS (R)	460	0,17	0,13	37,73

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	373,21	23	16,23	3,95	<0,0001
TRATAMIENTO	3,32	1	3,32	0,81	0,3691
CEPA	369,89	22	16,81	4,10	<0,0001
Error	1789,59	436	4,10		
Total	2162,80	459			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,37131

Error: 4,1046 gl: 436

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.
I+D	5,29	230	0,13 A
D	5,46	230	0,13 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,25918

Error: 4,1046 gl: 436

CEPA	Medias	n	E.E.
20	3,71	20	0,45 A
5	4,17	20	0,45 A B
16	4,32	20	0,45 A B C
12	4,33	20	0,45 A B C
22	4,37	20	0,45 A B C
18	4,59	20	0,45 A B C D
11	4,77	20	0,45 A B C D E
6	4,83	20	0,45 A B C D E
13	5,09	20	0,45 B C D E F
23	5,11	20	0,45 B C D E F
1	5,23	20	0,45 B C D E F
8	5,52	20	0,45 C D E F G
2	5,58	20	0,45 C D E F G
10	5,73	20	0,45 D E F G H
15	5,75	20	0,45 D E F G H
19	5,75	20	0,45 D E F G H
7	5,78	20	0,45 D E F G H
3	5,82	20	0,45 D E F G H
21	5,97	20	0,45 E F G H
9	6,23	20	0,45 F G H I
17	6,63	20	0,45 G H I
14	6,89	20	0,45 H I
4	7,33	20	0,45 I

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

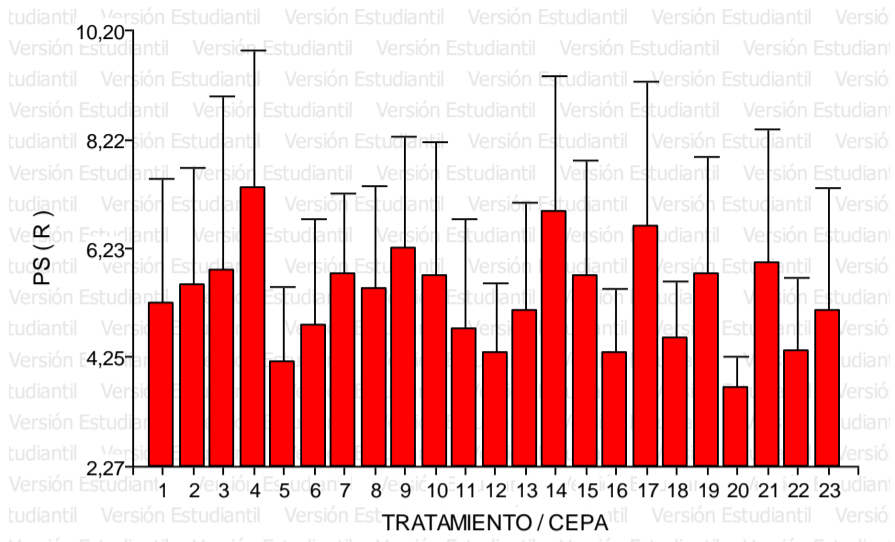


FIG. 68.
Promedio y desviación estándar para PS (R).

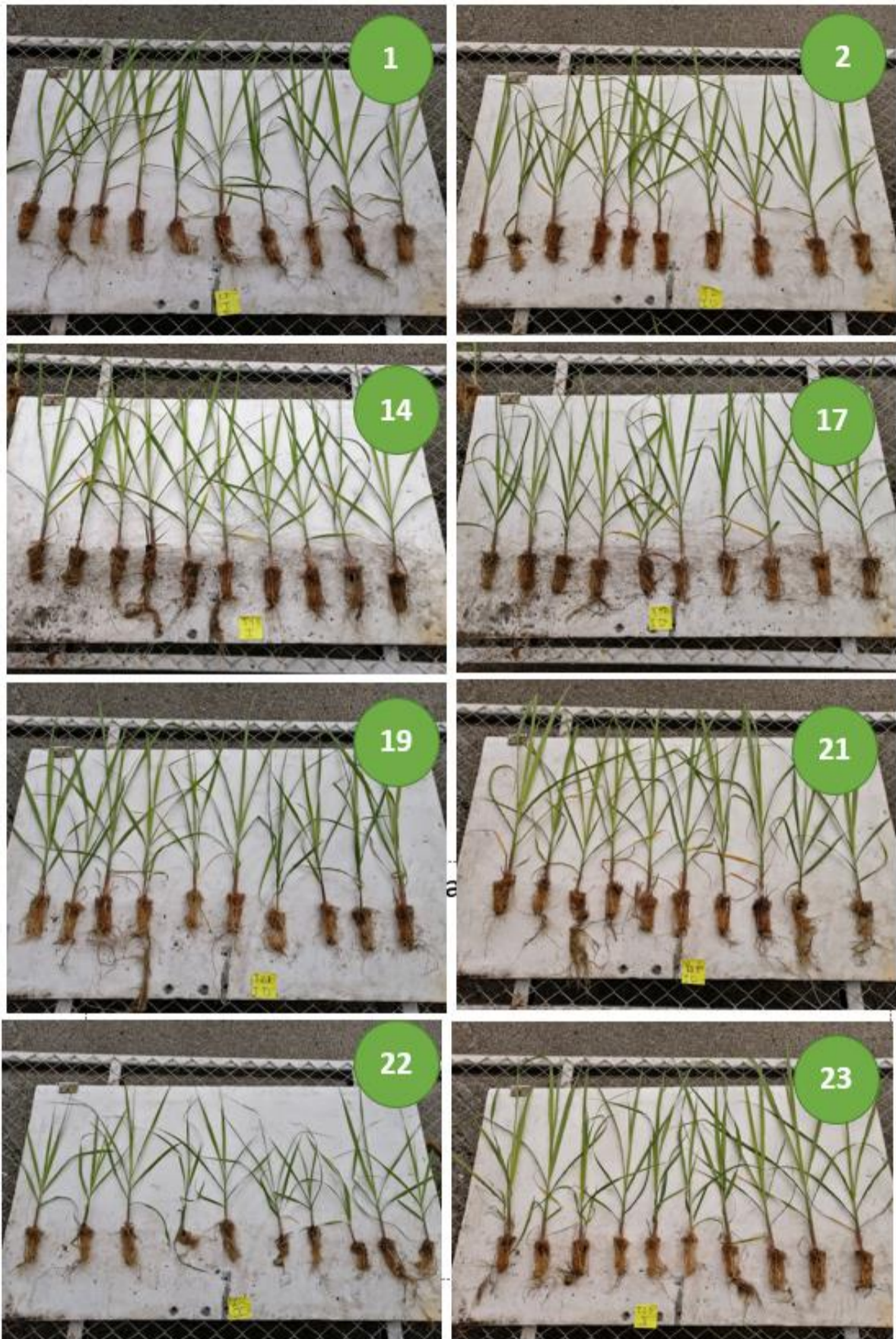


FIGURA 69.
Características y desarrollo vegetativo de los 5 mejores tratamientos, correspondientes a los aislamientos 1 (Raíz-suelo TAB 16), 2 (Raíz-suelo TAB 12), 14 (FCA S PEDR BACT #76), 17 (D 0719-BAC 10 #23) Y 19 (D 0719 BAC 17 #64), en comparación a testigo CALDO (21), ABSOLUTO (22) y COMERCIAL (23).

6.2. Efecto del biocarbón y otros insumos biológicos sobre la producción y fitosanidad de la caña de azúcar en el ingenio Taboga, Cañas, Guanacaste (Alejandro Rodríguez Morales, Javier Bolaños Porras).

Sin duda alguna el suelo es el principal recurso para la producción agrícola y pecuaria, por lo que su mantenimiento y mejoramiento de su calidad debe de ser foco de atención que su calidad Uno de los aspectos más relevantes

El biocarbón es el producto de la descomposición térmica de materiales orgánicos (biomasa) con escaso o limitado suministro de oxígeno (pirólisis), a temperaturas relativamente bajas (inferiores a los 700 °C) y que es destinado a uso agrícola, lo que hace que sea diferente al carbón usado como combustible y al carbón activado (Figura 70). La International Biochar Initiative o IBI (2012) en su “Standardized Product Definition and Product Testing Guidelines for Biochar that is Used in Soil”, define al biocarbón como *“un material sólido obtenido de una conversión termoquímica de biomasa en un ambiente limitado de oxígeno”*.



FIGURA 70.
Características del biocarbón.
Fuente: A. Carmona.

Dentro de los beneficios más importantes que resultan de la aplicación del biocarbón como enmienda al suelo, figuran los siguientes:

Mejora la aireación y retención de agua del suelo: La incorporación de biocarbón al suelo puede alterar sus propiedades físicas tales como la textura, la estructura, la distribución del tamaño de poro, el área superficial total, y la densidad aparente, permitiéndole a la raíz de las plantas crecer mejor y explorar un volumen de suelo mayor. Al aumentar la retención de agua del suelo, permite reducir los costos por riego. Adicionalmente le confiere al suelo mayor permeabilidad, reduciendo la escorrentía superficial y la pérdida de la capa fértil del suelo por erosión.

Incrementa la capacidad de intercambio catiónico (CIC) del suelo: El biocarbón presenta una elevada superficie específica, alta carga superficial negativa y elevada densidad de carga, por lo que aumenta la retención de cationes como NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} ; esto a su vez incrementa la eficiencia en el uso de fertilizantes y permite reducir las cantidades que se aplican.

Regula el pH: El biocarbon usado como enmienda regula el pH del suelo.

Mejora la vida y procesos biológicos del suelo: El biocarbón es una fuente rica en carbono que activa la microbiota en el suelo, favoreciendo procesos como la fijación de Nitrógeno, la solubilización de elementos químicos como el Fósforo y el Potasio, la mineralización de la materia orgánica y la supresividad ante agentes fitopatógenos, entre otros. Además funciona como portador (acarreador) de microorganismos, mejorando la actividad de agentes bioestimulantes, bioprotectores o biorremediadores (Figura 71).

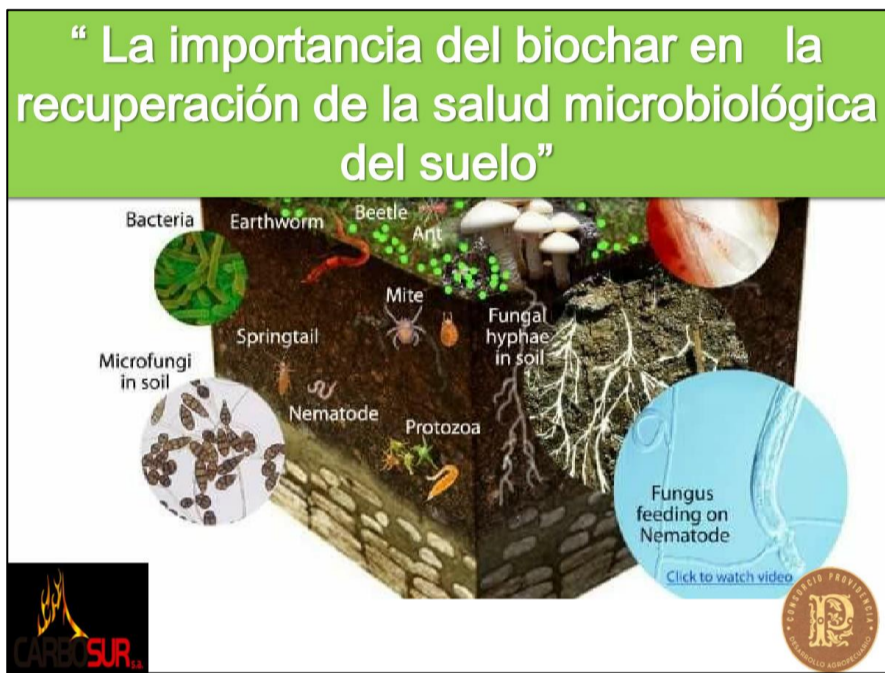


FIGURA 71.
El biocarbón y su efecto sobre los macro y microorganismos en el suelo.
Fuente: A. Carmona.

Secuestro de carbono y cambio climático: La aplicación de biocarbón al suelo es un mecanismo de secuestro de carbono. El biocarbón posee alto contenido de carbono orgánico, altamente resistente a la descomposición, por lo que funciona como un almacén de formas recalcitrante de este elemento cuando es aplicado al suelo como mejorador, por lo que se puede considerar como un factor inhibitor del cambio climático. También disminuye las emisiones de óxido nitroso que es otro GEI (Figura 72).

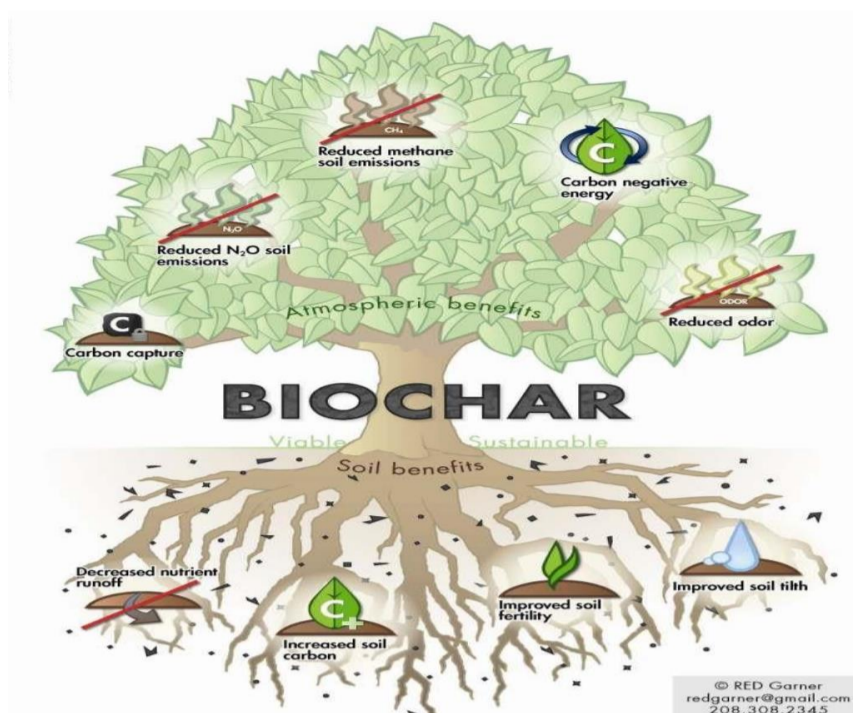


FIGURA 72.
El biocarbón y su efecto como sumidero de GEI y las propiedades del suelo.
Fuente: A. Carmona.

El biocarbón se produce en hornos artesanales o en hornos industriales y puede utilizarse prácticamente cualquier tipo de biomasa vegetal, como grana de arroz, bagazo de caña, raquis (palma), fibra de coco, broza de café, gallinaza, estiércoles, desechos de madera, aserrín y lodos de fábrica (Figura 73). En un horno industrial el proceso puede demorar entre 4 y 8 horas por tanda, dependiendo del tipo de biomasa y de la capacidad del horno. El material que entra pierde entre el 25 y 30% de su peso. Dos subproductos del proceso de elaboración del biocarbón son el vinagre y el biogás.



FIGURA 73.
Fuentes de biomasa útiles para fabricar biocarbón, horno para su fabricación y estado final de la biomasa a partir de leña.
Fuente: A. Carmona.

Parcela experimental.

Las características de las parcelas piloto para implementar y evaluar la aplicación del biocarbón sobre las variables productivas y fitosanitarias del cultivo, se describen a continuación.

1. Manejo orgánico implementado por la finca + biocarbón.
2. Inicio con caña planta de la variedad seleccionada en conjunto entre el ingenio y DIECA.
3. Posibilidad de inocular el biocarbón con agentes biológicos bioestimulantes que están en fase de evaluación preliminar en DIECA.
4. Aplicación de biocarbón en frecuencia y cantidad establecida por DIECA; el volumen por unidad de área aun no está definido. Igualmente esta en estudio la factibilidad de trasladar el horno para producir el biocarbón en finca, o en su defecto, trasladar el biocarbón fabricado en DIECA.
5. Parcela de no más de una hectárea de extensión.
6. Estricto monitoreo y control biológico de plagas.
7. Estricto registro de costos de producción.
8. Variables de medición: materia orgánica (%), pH, acidez, CIC, elementos mayores y menores, grupos filogenéticos de microorganismos.
9. Variables de respuesta: presencia e intensidad de ataque de plagas y enfermedades, producción (tonelaje, rendimiento, etc.).
10. Análisis de datos: correlación entre variables de medición y de respuesta.
11. Duración del estudio: a discutir.