

NOTA TÉCNICA

Nuevas propuestas de investigación y desarrollo biotecnológico con microorganismos benéficos para la caña de azúcar.

Alejandro Rodríguez Morales¹

RESUMEN

Para mantener su competitividad y rentabilidad, y a la vez, corresponder con las demandas de los consumidores por productos libres de agroquímicos y producidos con mínimo impacto ambiental y social, la agricultura moderna debe enfocarse en el desarrollo de alternativas biotecnológicas con microorganismos benéficos. Los microorganismos benéficos protegen a las plantas del ataque de plagas, enfermedades y del efecto de eventos abióticos que las estresan; además, estimulan su crecimiento mediante la producción de reguladores de crecimiento (fitohormonas), la fijación y la solubilización de elementos esenciales como el Nitrógeno, el Fósforo y el Potasio, y mediante la eliminación de sustancias tóxicas acumuladas en el suelo (biorremediación). Los dos grupos de microorganismos benéficos que han mostrado mayor potencial para uso comercial en la agricultura, son los Agentes de Control Biológico (ACB), también conocidos como “Bioplaguicidas”, y más recientemente, el grupo de las Bacterias Promotoras de crecimiento Vegetal (BPCV), tradicionalmente conocidos como “Biofertilizantes” o “Bioinoculantes”. Se explica a continuación las características principales y el modo de acción de estos insumos biológicos, y con base en una amplia revisión sobre los avances científicos alcanzados en su producción y utilización, se propone varias líneas de investigación y desarrollo (I+D) para el cultivo de la caña de azúcar.

1. INTRODUCCIÓN.

Si bien la Revolución Verde permitió incrementar la producción agrícola significativamente mediante el desarrollo de semillas mejoradas, plaguicidas y fertilizantes químicos (agroquímicos en general), a lo largo de las décadas, esto ha tenido un impacto negativo en la sostenibilidad de la agricultura, así como en la salud humana y en el ambiente (Pindi y Satyanarayana 2012; Damalas y Koutroubas 2018). Los efectos negativos derivados del uso de plaguicidas, están ampliamente documentados, pero paradójicamente, si no se les utiliza, se podrían experimentar pérdidas de entre el 31 y el 42% de la producción de alimentos (Peláez y Mizukawa 2017).

Actualmente la población mundial ronda los 7,0 billones de personas, pero se espera que para el año 2050 se incremente a 9,1 billones, lo que supondrá un incremento del 70% en la producción de alimentos (Singh *et al* 2018), por lo que, de no adoptar sistemas de producción más sostenibles, supondrá también un incremento en el uso de plaguicidas, tal como ha venido sucediendo. A un menor plazo, para el año 2030 se estima que la producción de alimentos deberá ser al menos un 60% mayor que la actual, donde el 85% provendrá de países en desarrollo (Pindi y Satyanarayana 2012).

¹ Ingeniero Agrónomo. Máster. Funcionario del Departamento de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar DIECA-LAICA. Jefe Programa Control Biológico. Teléfono: (506) 24-94-11-29/24-94-75-55. E-mail: arodriguez@laica.co.cr

Datos puntuales que demuestran el incremento en el consumo de plaguicidas que se viene presentando en los últimos años, señalan por ejemplo, que entre el 2000 y el 2013, su consumo a nivel mundial aumentó en 140%, estableciéndose en un valor de mercado de USD 61,0 billones/año (Peláez y Mizukawa 2017); asimismo, para el año 2013, el consumo de plaguicidas se estableció en 45,39 t (Singh *et al* 2018).

Está ampliamente documentado que el uso indiscriminado de plaguicidas, debido a procesos de presión de selección, resulta en la adquisición de resistencia por parte de las plagas meta, sean estas insectos, patógenos, nematodos o de cualquier otra naturaleza (Singh *et al* 2018). La situación se agudiza al comprobarse que algunos plaguicidas como los neonicotinoides, afectan a las abejas polinizadoras y con esto, la polinización de decenas de cultivos, reduciendo su productividad de forma significativa. Es por esta razón que a partir del año 2016, 5 ingredientes activos (IA) con esta sustancia, fueron prohibidos en la Unión Europea (Peláez y Mizukawa 2017). Este tipo de casos ha resultado en la instauración de nuevas y más estrictas regulaciones para el uso de plaguicidas a nivel internacional, y a la vez, ha obligado a las empresas químicas a invertir más fondos en el desarrollo de nuevas moléculas con concentraciones reducidas de IA y con mayor selectividad; por supuesto, los mayores costos de desarrollo han provocado un incremento en el precio final de estos productos, haciéndolos prohibitivos para la agricultura de baja escala o de subsistencia (Peláez y Mizukawa 2017; Damalas y Koutroubas, 2018).

La situación con el uso de fertilizantes es también crítica, pues en su consumo, media la noción de que estas sustancias no son igual de tóxicas y contaminantes que los plaguicidas; no obstante, en su producción y utilización, se producen enormes cantidades de gases con efecto invernadero (GEI). El caso más representativo de contaminación derivada de la aplicación de fertilizantes, se presenta con las fuentes nitrogenadas, cuya producción requiere altas cantidades de energía proveniente de fuentes fósiles (bunker, gas, nafta y carbón, entre otros), por lo que se producen grandes emisiones de dióxido de Carbono (CO₂) a la atmósfera.

Por otra parte, a nivel de suelo, los nitratos solubles provenientes de los fertilizantes nitrogenados son transformados a óxido nitroso (N₂O), que es un GEI con un potencial de calentamiento 300 veces mayor que el propio CO₂ (Vejan *et al* 2016). Un dato alarmante es que en los Estados Unidos de América (EE.UU), el 74% de las emisiones de N₂O son derivadas de la agricultura (Rakshit *et al* 2015). Otro efecto detrimental a nivel del suelo, se da porque estas sustancias favorecen la pérdida gradual de la materia orgánica y de algunos microelementos que son básicos para el crecimiento y producción de los cultivos; asimismo, algunas fuentes como la Urea (CO(NH₂)₂), tienden a acidificar el suelo, afectando su microbiología y reduciendo la disponibilidad de macroelementos como el Fósforo y el Calcio, pero aumentando la disponibilidad de microelementos como el hierro y el aluminio, los cuales al sobrepasar las necesidades de las plantas, producen intoxicaciones y problemas de crecimiento y desarrollo de la raíz y la parte aérea. Estos efectos finalmente derivan en una menor respuesta de las plantas a la fertilización, lo que unido a la ya reconocida baja eficiencia de las fuentes nitrogenadas, la cual fluctúa entre el 25 y 50% (Pindi y Satyanarayana 2012; Pindy y Satyanarayana 2012; Rivera-Urbalejo *et al* 2017), conduce a incrementar las tasas de aplicación de fertilizantes y con esto, a agravar la situación.

Adicionalmente, otros efectos negativos a nivel ambiental y de la salud, se presentan cuando por escorrentía superficial, las fuentes con Nitrógeno arriban a cuerpos de agua superficiales provocando su eutrofización (incremento desmedido de algas) y consiguiente disminución en la concentración de oxígeno en el agua, lo que produce finalmente la muerte de muchas especies acuáticas (Rivera-Urbalejo *et al* 2017). A nivel subterráneo, debido a procesos de lixiviación, los nitratos pueden alcanzar mantos acuíferos utilizados para el consumo humano, lo cual es un riesgo, pues se ha comprobado que la ingesta de agua contaminada con nitratos, está asociada a ciertos tipos de cáncer como el cánceres colo-rectal y el cáncer de mama (Espejo¹ *et al* 2016; Espejo² *et al* 2016). La figura 1 resume las consecuencias ambientales derivadas de la producción y aplicación de los fertilizantes nitrogenados.

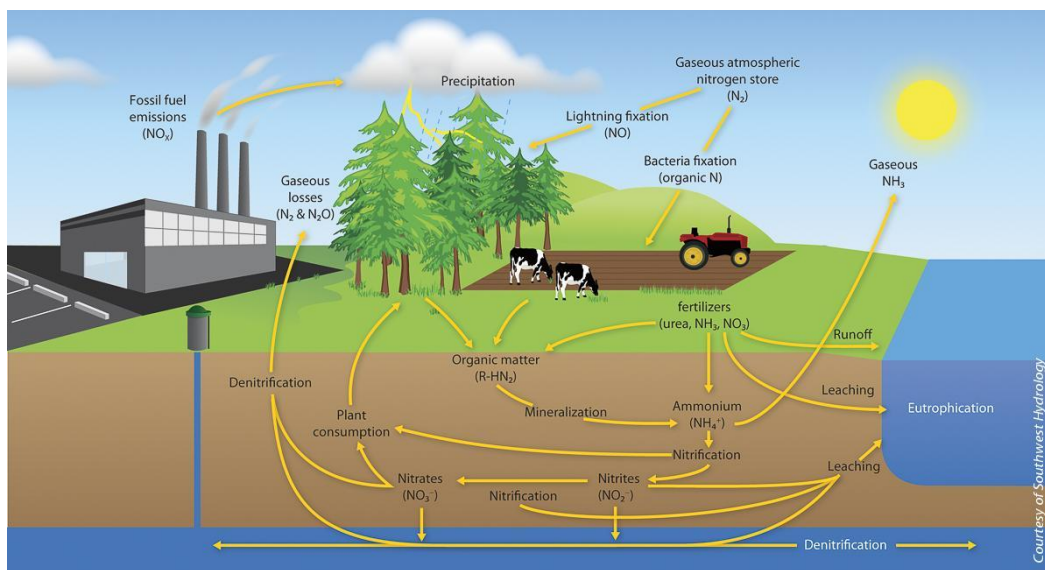


Figura 1. Ciclo del Nitrógeno y efectos derivados de la producción y utilización de fertilizantes nitrogenados.

Fuente: Rosenstock *et al* 2012.

La caña de azúcar es un cultivo ampliamente distribuido a nivel mundial en al menos 130 países, estimándose un área de siembra de entre 25 y 40 millones de hectáreas, con una productividad promedio entre las 60 y 80 t/ha (Sumana y Singh 2012, Velasco-Velasco 2014). Ocupa el noveno lugar en importancia produciendo anualmente USD 56,0 billones (Velasco-Velasco 2014). Es además un cultivo altamente extractor de nutrientes del suelo y por ello, requiere altos niveles de fertilización que van desde 130-39-280 (Nitrógeno, Fósforo y Potasio); sin embargo, considerando únicamente la fertilización nitrogenada, las tasas de aplicación pueden sobrepasar los 300 kg/ha/año (México, Venezuela, Cuba), e incluso, los 400 kg/ha/año (Hawaii, EE.UU) (Rivera-Urbalejo *et al* 2017). Por el contrario, en Brasil, la fertilización con Nitrógeno necesaria para obtener rendimientos agrícolas elevados (cerca de las 100 t/ha/año), por décadas se ha establecido entre los 50 y 60 kg/ha/año, sin encontrar evidencia de disminución en las reservas

de este elemento en el suelo. Esto, al menos en un 70%, ha sido atribuido al aporte de las bacterias fijadoras de Nitrógeno (BFN) (Velasco-Velasco 2014; Rivera-Urbalejo et al 2017).

Ante este panorama, y considerando los efectos del cambio climático que cada año se presentan con mayor severidad, la agricultura moderna debe de adoptar una visión sostenible y adaptable, aprovechando el gran potencial de los microorganismos benéficos (hongos, bacterias, algas, etc.), para estimular el crecimiento de las plantas y defenderlas del ataque de insectos y patógenos, así como de condiciones de estrés. Los dos grupos más exitosos de microorganismos benéficos que podrían aportar estos beneficios son los Agentes de Control Biológico (ACB) y las Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (BPCV), ingredientes principales para la preparación de los Bioplaguicidas y los Biofertilizantes.

Se describe a continuación las principales características, beneficios y aplicaciones biotecnológicas que aportan estos aliados biológicos. Asimismo, con base en los avances científicos alcanzados, se proponen varias líneas de investigación y desarrollo (I+D) con potencial, para complementar los esfuerzos en *pro* de la sostenibilidad, productividad y rentabilidad del cultivo de la caña de azúcar.

2. Objetivo Principal.

Proponer líneas de I +D con insumos biotecnológicos a base de microorganismos benéficos, con potencial para complementar la nutrición y sanidad del cultivo de la caña de azúcar, y contribuir con la sostenibilidad y rentabilidad de la actividad cañera.

3. Objetivos Específicos.

- 3.1. Estudiar los avances en el desarrollo y utilización de Biofertilizantes y Bioplaguicidas, su mercado e impacto en la producción de cultivos a nivel mundial.
- 3.2. Identificar líneas de I + D con alto potencial de implementación en el cultivo de la caña de azúcar.
- 3.3. Proponer proyectos específicos enfocados en la atención de las principales necesidades nutricionales y fitosanitarias del cultivo de la caña de azúcar.

4. Bioplaguicidas, biofertilizantes y su mercado global.

Los bioplaguicidas son materiales naturales derivados de animales, plantas, hongos, virus y bacterias, así como ciertos minerales, que se utilizan para el control de plagas. La Agencia Norteamericana para la Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés), divide los bioplaguicidas en tres clases: a) Plaguicidas Microbianos, cuyo IA son microorganismos con efecto supresor de plagas y enfermedades, como por ejemplo: hongos y bacterias entomopatógenos (*Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Bacillus thuringiensis*), y hongos y bacterias que controlan patógenos (*Trichoderma* spp, *Bacillus subtilis*); b) Plaguicidas Bioquímicos, cuyo IA son

sustancias naturales extraídas de microorganismos y plantas, que actúan mediante mecanismos que no son tóxicos; se incluye dentro de este grupo a las feromonas y otros atrayentes; c) Agentes Incorporados a las Plantas (PIP, por sus siglas en inglés), como por ejemplo, plantas modificadas genéticamente que producen sustancias con efecto plaguicida (Olson 2015; Peláez y Mizukawa 2017).

En las últimas 2 décadas los bioplaguicidas han adquirido mayor popularidad al ser considerados más seguros que los plaguicidas convencionales. Esto se debe a: que son más selectivos y específicos sobre determinada plaga de interés: son efectivos en pequeñas cantidades; no generan resistencia; se descomponen rápidamente en el ambiente sin dejar residuos peligrosos; no requieren de períodos de reingreso o de carencia; y porque pueden combinarse con otras prácticas agrícolas, incluso, con la aplicación de plaguicidas. Por estas razones los bioplaguicidas forman parte importante dentro del Manejo Integrado de Plagas (MIP) y generan año a año, mayor interés en los productores más interesados en el manejo ecológico y sostenible de las enfermedades (Patel *et al* 2014; Olson 2015; Peláez y Mizukawa 2017; Damalas y Koutroubas 2018).

El uso de bioplaguicidas comenzó a finales del siglo 18 con la aplicación de hongos para el control de insectos. Uno de los casos más documentados fue reportado por Agostino Bassi (Italia), quien en 1835 demostró que las esporas del hongo “muscardina blanca” (actualmente *B. bassiana*), eran las responsables de la muerte del gusano de la seda; como reconocimiento, la especie del hongo *B. bassiana*, deriva de su apellido. A pesar que los primeros descubrimientos y avances ocurrieron con hongos, el prototipo de un bioplaguicida proviene de una bacteria: *B. thuringiensis* (*Bt*), la cual produce cristales tóxicos que al ser ingeridos por el insecto, a nivel de tracto digestivo produce agujeros y provoca la contaminación de la hemolinfa con bacterias, lo que finalmente deriva en una septicemia masiva y en la muerte del insecto. Entre el 2014 y 2015, el 75% a 90% del mercado mundial de bioplaguicidas, perteneció a productos derivados de *Bt* (Olson 2015; Damalas y Koutroubas 2018).

El mercado actual de los bioplaguicidas tiene un valor de poco más de USD 3,0 billones al año, lo que representa apenas el 5% del mercado mundial de los plaguicidas. No obstante, este segmento de la industria está teniendo un crecimiento compuesto anual (CCA) del 8,64% y se espera que se mantenga esta tendencia al menos hasta el año 2023, cuando alcanzaría un valor de mercado cercano a los USD 4,5 billones, representando el 7% del mercado global. De continuar esta tendencia, se esperaría que para el 2050, ambos mercados equiparen sus ventas en cerca de USD 60 billones al año (Figura 2); sin embargo, el plazo podría reducirse de manera importante, si recrudescen y se expanden las regulaciones internacionales sobre el uso de plaguicidas convencionales, y si su costo de desarrollo continúa aumentando como hasta la fecha (Olson 2015; Damalas y Koutroubas 2018). Grandes compañías tradicionalmente ligadas al desarrollo de plaguicidas (BASF, Bayer, Syngenta y Monsanto, entre otras), han visualizado esta tendencia y desde el 2012 vienen en un proceso de adquisición de medianas y pequeñas compañías de bioplaguicidas, buscando ampliar su portafolio de Bioplaguicidas (Peláez y Mizukawa 2017).

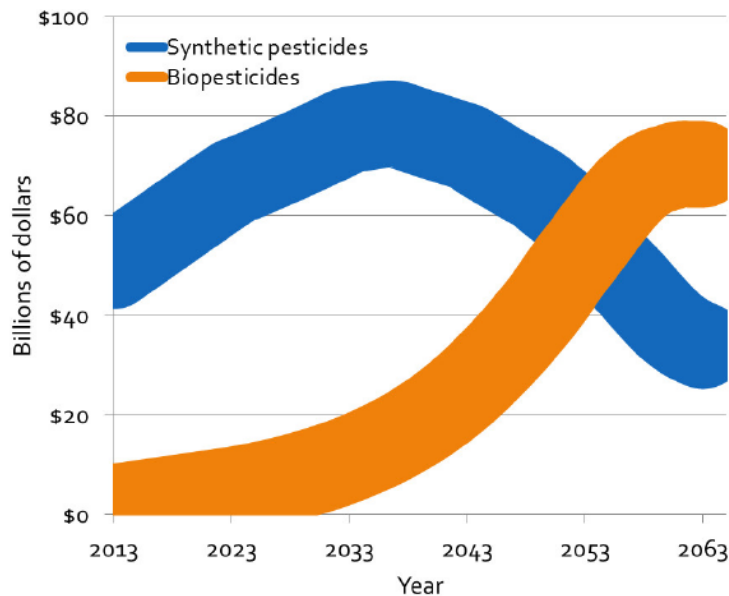


Figura 2. Tendencias presentes y futuras en el mercado y ventas de los plaguicidas sintéticos y los bioplaguicidas.

Fuente: Olson, 2015.

Al igual que sucede con los Bioplaguicidas, el uso de los Biofertilizantes viene creciendo en importancia a nivel mundial, principalmente asociado a las constantes críticas y presiones ante el uso de los fertilizantes químicos sintéticos y al efecto negativo que estos producen en el suelo, el agua y la atmósfera.

En un sentido amplio, los biofertilizantes son preparaciones microbianas (sólidas o líquidas) que contienen células vivas de diferentes microorganismos que tienen la habilidad de movilizar nutrientes del suelo, haciéndolos fácilmente asimilables por las plantas. Otra definición más amplia señala que son sustancias que contienen microorganismos vivos que colonizan la rizósfera (parte del suelo íntimamente ligada a la raíz) y en relación con la planta, le facilitan la absorción de nutrientes, estimulan el crecimiento y las defienden tanto de factores bióticos, como abióticos (Vejan et al 2016; Velasco-Velasco 2014). Los biofertilizantes son utilizados en formulaciones vivas que al aplicarse a las semillas, raíces o directamente al suelo, movilizan sus nutrientes, degradan sustancias tóxicas, aceleran la descomposición de la materia orgánica y en general, coadyuvan en la restitución de microflora y la salud del suelo (Subirós 2011; Bhattacharjee y Dey 2014; Vejan et al 2016;). Es por estas razones que han mostrado gran potencial como fuente renovable y ambientalmente adecuada para la nutrición de las plantas.

Es importante diferenciar los Biofertilizantes de los comúnmente denominados “Biofermentos” o “bioles”. Como se indicó, los Biofertilizantes son productos en estado sólido o líquido, diseñados exclusivamente para que contengan microorganismos específicos, con modos de acción bien conocidos (por ejemplo, producción de reguladores, fijación de Nitrógeno, solubilización de Fósforo, promoción de crecimiento). Por el contrario, los Biofermentos son sustratos líquidos

altamente colonizados por microorganismos descomponedores (no identificados), que se producen al fermentar, bajo condiciones anaerobias, un sustrato altamente colonizado (mantillo de bosque), junto con una fuente de Carbono (melaza); estos pueden contener microorganismos con funciones similares a las de los Biofertilizantes, pero no son diseñados exclusivamente para ese fin.

Las bacterias colectivamente denominadas como Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (BPCV), son el grupo más estudiado y utilizado para la producción de Biofertilizantes, dada su capacidad de fijar Nitrógeno (N₂), solubilizar fosfatos y generar fitohormonas (auxinas, giberelinas y citoquininas) que estimulan el crecimiento vegetal (Bhattacharjee y Dey 2014; da Silva *et al* 2015; da Silva *et al* 2017). Precisamente, dadas las consideraciones ambientales derivadas del uso de los fertilizantes nitrogenados que anteriormente fueron señaladas, la biofertilización con bacterias fijadoras de Nitrógeno (BFN), sobre todo aquellas no simbióticas (de vida libre), ha adquirido gran preponderancia frente a otros tipos de biofertilizantes (Velasco-Velasco 2014). Estos productos pueden incrementar en al menos un 20% el crecimiento de las raíces, parte aérea y en general de la planta (da Silva *et al* 2017).

Los géneros y especies de BFN más ampliamente estudiados son: *Azospirillum sp*, *Herbaspirillum sp*, *Bacillus spp* y *Gluconacetobacter diazotrophicus* (da Silva *et al* 2015; Bhattacharjee y Dey 2014; Becerra-de Armas *et al* 2014; da Silva *et al* 2017). *Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum* y *A. amazonense*, pueden fijar entre 20 y 40 kg de Nitrógeno/ha/año en cultivos como cereales, oleaginosas y algodón; por su parte, *G. diazotrophicus* asociada a la caña de azúcar, sorgo y café, tiene el potencial de fijar hasta 30 kg/ha/año de Nitrógeno. Algunos reportes han informado que *G. diazotrophicus* puede fijar hasta 100 kg/ha/año. El cuadro 1 resume las principales BPCV y sus modos de acción.

Cuadro 1.
Principales Bacterias Promotores de Crecimiento Vegetal y su Modo de Acción.

Especies de bacterias aisladas en caña de azúcar	Efectos beneficiosos principales en la planta	Principales estudios realizados
<i>Azospirillum brasilense</i>	Fijación de nitrógeno Producción de fitohormonas de crecimiento vegetal	Aislamientos, identificación y validación en campo Medios de cultivo
<i>Azotobacter sp.</i>	Fijación de nitrógeno Producción de fitohormonas de crecimiento vegetal	Aislamiento, identificación y caracterización, validación en campo
<i>Acetobacter diazotrophicus</i> (<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>)	Fijación de nitrógeno Producción de fitohormona vegetal Estimulador del crecimiento	Aislamientos, identificación y caracterización, validación en campo
<i>Burkholderia cepacia</i> (<i>Pseudomonas</i>)	Efectos antagónicos ante los hongos patógenos	Mecanismos de acción de la bacteria
<i>Pantoea sp.</i>	Mecanismo de acción como bacteria endófito	Aislamientos

Fuente: Torriente 2010, citado por Velasco-Velazco 2014).

Las formulaciones de Biofertilizantes pueden ser en polvos, gránulos, pellets, cápsulas o en suspensiones aceitosas o acuosas, dependiendo del material que será inoculado y del equipo de aplicación. La formulación más tradicional y antigua de Biofertilizantes o Bioinoculantes, es el caso de la bacteria *Rhizobium sp*, que fija Nitrógeno de forma simbiótica en plantas de la familia

Fabaceae (leguminosas). La bacteria se mezcla con acarreador o “carrier”, generalmente turba, y este producto se usa para crear una cobertura sobre la semilla, la cual al germinar, se infecta con la bacteria.

En años más recientes se ha descubierto que los biofertilizantes, sobre todo aquellos a base de BPCV, sean éstas rizosféricas (que viven en la rizósfera) o endófitas (que viven dentro del tejidos vegetales), son más efectivos cuando se aplican a nivel de vivero, o incluso durante el proceso de aclimatación de clones provenientes de cultivo de tejidos, ya que esta práctica asegura una máxima colonización debido a que el material vegetal está prácticamente desprovisto de bacterias que podrían antagonizar. A este proceso se le denomina en inglés “bio-priming” o “bio-hardening”, algo similar a “bio-endurecimiento” (Jisha *et al* 2013; Rakshit *et al* 2015; Rivera-Urbalejo *et al* 2017). Este tema será ampliado posteriormente.

El uso de los Biofertilizantes (también llamados Bioestimulantes o Bioinoculantes) en la agricultura, ha tenido un crecimiento sostenido del 10% anual en la última década. En países como la India en donde esta tecnología está bien posicionada, el consumo anual promedio se establece en 45.000 t, pero la producción apenas llena el 50% de la demanda. Los esfuerzos institucionales y privados en ese país, procuran alcanzar una producción de al menos 60.000 t para el año 2020 (Pindi y Satyanarayana 2012). Se ha calculado que el mercado mundial de Biofertilizantes podría rondar los USD 3,0 billones (Rakshit *et al* 2015).

5. Avances en el uso de Biofertilizantes en la caña de azúcar.

En Costa Rica hay muy pocas referencias sobre el potencial de los Biofertilizantes en el cultivo de la caña de azúcar. Una de las pocas pero más promisorias experiencias se llevó a cabo en la provincia de Guanacaste, cantón de Carrillo, en el ingenio El Viejo, en donde se reportó que la aplicación de un Biofertilizante a base de *Azotobacter chroococcum*, tres cepas de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas cepacea* y *P. fluorescens*, en combinación con el 50% de la dosis normal de Nitrógeno (130 kg/ha de urea), produjo los mismos rendimientos agrícolas e industriales que caña producida con la dosis total de Nitrógeno (Subirós 2011).

En Cuba aplicación de Biofertilizantes a base de BPCV inició en los años 90 y los avances más importantes se ha obtenido con *A. brasilense*, *G. diazotrophicus*, *Burkholderia cepacia* y *Pantoea* sp, aplicadas utilizando la cachaza como vehículo o “carrier”. Los resultados más positivos se han logrado utilizando cachaza y no biofertilizantes líquidos; bajo este sistema se han conseguido obtener hasta 13,62 t/ha más de caña, que los controles 100% fertilizados con fuentes químicas. En resumen, el 76% de las experiencias en campo en Cuba, han sido positivas logrando rendimientos entre 25 y 35% superiores con biofertilizantes (Velasco-Velasco 2014). Se ha identificado además, un efecto varietal muy marcado, por lo que la tecnología debe evaluarse también a ese nivel (da Silva *et al* 2017). Utilizando *B. cepacia* los resultados más promisorios revelan incrementos agroindustriales de hasta el 25%. Se demostró además que esta bacteria es una eficaz solubilizadora de fosfatos. Por el contrario, aunque *Pantoea dispersa* fue catalogada como una eficaz fijadora de Nitrógeno, los resultados en campo no han sido concluyentes (da Silva *et al* 2017). Otros resultados positivos en campo se lograron aplicando un biofertilizante a base de *Azospirillum* sp y la variedad C86-12, bajo dos modalidades: aspersión con posterior

arroke de paja de caña y mediante incorporación al suelo. Los resultados indicaron nuevamente una buena respuesta a la inoculación de *A. brasilense* (75 L/ha) y el 40% de la fertilización normal con Nitrógeno, bajo la modalidad asperjado con arroke de paja de caña, con lo que se alcanzó una producción de 101,08 t/ha, mientras que el testigo alcanzó las 60 t/ha (Becerra-De Armas *et al* 2014).

En Colombia utilizando plantas de la variedad CC 934418 sembradas en macetas con un sustrato rico en nutrientes, se evaluó la eficacia individual de una cepa de *A. brasiliense*, *A. chroococcum* y el hongo *Trichoderma lignorum*, sobre las principales variables de crecimiento de la caña de azúcar (longitud del tallo y raíz, número de raíces y hojas y diámetro del tallo), en tres períodos después de la inoculación: 15, 30 y 45 días. Los resultados mostraron para todas las variables y cepas evaluadas, un mayor crecimiento vegetativo, en comparación al control no inoculado. Entre los aislamientos se destacó *A. brasilense* (Serna-Cock *et al* 2011).

Brasil, país pionero en la investigación y desarrollo de biofertilizantes a base de BPCV, ha mostrado los avances más significativos y el uso comercial más extendido. Ejemplos de resultados positivos indican que la mezcla de *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* y *G. diazotrophicus* aplicadas 60 días después del rebrote de la variedad Rb 96 7515, bajo un régimen de aplicación de Nitrógeno de 15 kg/ha (lo que corresponde a 1/3 de la aplicación comercial en ese país), permitió en un lapso de 3 cosechas, incrementar en 37% el número de tallos respecto al control. Asimismo, la productividad en la primera y segunda cosecha aumentó en 5 y 24%, respectivamente. La primera cosecha estuvo influenciada por un período fuerte de sequía. En un segundo experimento utilizando parcelas de mayor tamaño, se obtuvieron rendimientos superiores en un 19 y 18% en cosechas consecutivas, respecto al control, lo que representó 11 y 13 t/ha. No se determinaron diferencias en el contenido de sólidos solubles ni en el de azúcares polarizables en el jugo en ambos experimentos (da Silva *et al* 2017)

La utilización de biofertilizantes a base de *A. brasilense*, ha sido exitosa también en México, en donde bajo un sistema de fertilización reducido en Nitrógeno (50 kg/ha), los rendimientos fueron muy similares a los alcanzados bajo un sistema con 300 kg/ha de Nitrógeno (Velasco-Velasco 2014). Estos insumos han mostrado también potencial en la solubilización de fosfatos, principalmente con las bacterias *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus sp* y *Acidithiobacillus spp* (Velasco-Velasco 2014).

6. Avances en el uso de Bioplaguicidas en caña de azúcar.

Además de los ya conocidos y exitosos programas nacionales de producción de los hongos entomopatógenos (*Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*), para el combate de diferentes plagas que aquejan al cultivo como: el salivazo o baba de culebra (*Aeneolamia spp*, *Prosapia spp* y *Zulia vilior*), el picudo rayado (*Metamasius hemipterus*), la chinche de encaje (*Leptodictya tabida*) y la cigarrita antillana (*Saccharosydne saccharivora*), entre otros, existe gran potencial para el combate de otras plagas de importancia económica muy bien establecidas y extendidas, como es el caso del joboto (*Phyllophaga spp*), así como para otras plagas emergentes, pero sumamente agresivas como el áfido amarillo (*Sipha flava*) y la cochinilla harinosa (*Saccharicoccus sacchari*).

En el ámbito del control biológico de patógenos, el hongo *Trichoderma* spp presenta gran potencial para el control de la pudrición roja, causada por *Colletotrichum falcatum* y el combate del cogollo retorcido, causada por *Fusarium moniliforme*. Asimismo, se reporta potencial de control biológico de enfermedades bacterianas que ocasionan marchitez de la planta, mediante diferentes tipos de antagonistas, como se expondrá posteriormente.

En el desarrollo de ACB y de cualquier insumo biológico, debe de considerarse dos aspectos fundamentales: El uso de cepas nativas, locales o regionales, y la implementación de protocolos eficaces para seleccionar a aquellos candidatos con mayor potencial. Está ampliamente demostrado que el uso de cepas locales aumenta las probabilidades de éxito, puesto que éstas están adaptadas a las condiciones edáficas agroecológicas y climatológicas del sitio, en comparación con cepas foráneas (Mehnaz 2011). Asimismo, es de gran importancia poseer una robusta y amplia colección de cepas de los diferentes ACB provenientes de las diferentes regiones en donde se presentan las plagas, pues según las estadísticas, luego del proceso de evaluación, solamente una de cada 100 cepas evaluadas tiene el potencial de constituirse en un producto eficaz y rentable a escala comercial (Kohl *et al* 2011).

Con respecto al control del joboto (*Phyllophaga* spp), y en general, de plagas de insectos taxonómicamente cercanos, con una biología y generación de daños similar a éste, existe mucho potencial con bacterias esporuladas del género *Bacillus*, como *B. popilliae* y más recientemente con *B. thuringiensis*. Nuevas investigaciones reportan que aislamientos de *Bt* que poseen en su genoma al gen de la familia *cry 8*, reportado como codificador de toxinas específicas para escarábidos como *Holotrichia serrata*., resultan ser letales para el insecto. Se establece además en estos estudios, que la rápida acción de estas bacterias, aunado a su facilidad para reproducirlas a gran escala, incrementan el potencial de control frente a hongos como *Beauveria brongniartii*, *B. bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, así como las probabilidades de adoptar la tecnología (Singaravelu *et al* 2013). Aquellos aislamientos con el gen *cry8* se incluyen dentro del serovar *B. thuringiensis japonensis*. La biotecnología ha permitido formular productos a base de esta toxina, mediante la cual se reporta buen control de diferentes especies de jobotos (white grubs) como *Anomala orientalis*, *Popillia japónica*, *Maladera castanea* y *Rhizotrogus majalis*, afectando césped de canchas de golf, a dosis de hasta 100g/ha (Bixby *et al* 2014; Srikanth *et al* 2016).

Adicionalmente en el ámbito de las bacterias entomopatógenas, se reporta el potencial de aislamientos de la bacteria *Serratia marcescens* a nivel experimental en laboratorio, sobre *Phyllophaga blanchardi*. Los estudios sugieren que el efecto tóxico se debe a la acción de proteínas. En el mismo experimento larvas de *Spodoptera frugiperda* no mostraron sensibilidad a la bacteria, indicando esto algún nivel de especificidad (Chelvi *et al* 2011).

Si bien está ampliamente documentado que las bacterias muestran un enorme potencial, algunas investigaciones a nivel experimental en vivero y campo, reportan también altos niveles de control por parte de hongos como *M. anisopliae*; por ejemplo, en México, se ha informado mayor potencial por parte de *M. anisopliae*, sobre *B. bassiana*, ofreciendo el primero hasta un 80% de control en vivero (Nájera-Rincón *et al* 2005). Adicionalmente en la India, la aplicación experimental en campo de un aislamiento de *M. anisopliae* bajo 3 tipos de formulación (talco,

turba comprimida o lignita y formulación líquida) reportó altos niveles de control de *H. serrata* en niveles de 78,58%, 76,87% y 81,0%, respectivamente (Chelvi *et al* 2011). Lo anterior hace pensar que las fallas con estos y otros agentes biológicos, podrían estar asociadas a la ausencia de una formulación adecuada, que permita la sobrevivencia del microorganismo en el tiempo, y a la carencia de cepas nativas altamente patogénicas, que tengan la capacidad de establecerse en el suelo y generar epizootias. Adicionalmente, se reporta un excelente control de *H. serrata* mediante el hongo *B. brongniartii* del cual se tiene un producto a escala comercial en la India (Srikanth *et al* 2016).

Complementariamente, en la literatura se encuentra gran cantidad de reportes que señalan el alto potencial y afinidad de los nematodos entomopatógenos (NEPs), también llamados entomofílicos, principalmente por los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema*, para el control de plagas que atacan la raíz. Estudios a nivel de campo en canchas de golf han demostrado que *Popilia japónica* y *Cyclocephala borealis* son más susceptibles a los NEPs cuando están en su segundo y tercer estadio larval. Al evaluar a *H. zealandica* y *H. bacteriophaga* en un período de 2 años, se encontró un nivel de control de entre el 73-98% y del 34-97%, respectivamente para *P. japónica*, y del 72-96% y del 47-83% para *C. borealis*, respectivamente. En el experimento se evaluó también cepas de *S. kraussei* y *S. glaseri*, pero mostraron menores niveles de control (Grewal *et al* 2004).

Se sabe que la respuesta del insecto a los NEPs está muy asociada a su especie. Por ejemplo, a nivel de vivero, se encontró que *H. bacteriophaga* y *H. zealandica* ofrecen una virulencia moderada sobre *P. japónica*, *Anomala orientalis*, *C. borealis* y sobre *Maladera castanea*; por el contrario, *S. scarabaei* mostró alta virulencia sobre *R. majalis*, *P. japónica*, *A. orientales* y *M. castanea* (Kloppenhöfer *et al* 2006). Estudios complementarios han demostrado que la virulencia también está asociada a la concentración del nematodo (Girón-Pablo *et al* 2015). Otros estudios han determinado sinergia al aplicar combinaciones de NEPs y bacterias entomopatógenas como *B. thuriengiensis sbs japonensis (Btj)* (Koppenhö *et al* 1999) y combinaciones de NEPs con hongos como *Beauveria pseudobassiana* y *Metarhizium pingshaense* (Martínez-Hernández *et al* 2015).

El gran potencial de control biológico del áfido amarillo mediante el hongo entomopatógeno *Lecanicillium lecanii*, ha sido documentado en la literatura (Pardey AEB 2011) y además, observado frecuente en epizootias (infecciones masivas de insecto) en la zona del Valle Central del país, específicamente en la zona de influencia del ingenio La Argentina, en el cantón de Grecia, provincia de Alajuela (Figura 3), en los meses de julio y agosto, sobre la variedad LAICA 12 340. La virulencia y agresividad observadas por *L. lecanii* sobre el áfido amarillo, ilustra al entomopatógeno, como un agente con alto potencial para uso comercial. Similarmente en la misma zona mencionada, se han observado epizootias importantes provocadas por el hongo *Aspergillus parasiticus* sobre la cochinilla *Saccharicoccus sacchari* (Figura 3), lo cual ha sido también documentado en la literatura (Drummond *et al* 1991). Por tanto, este microorganismo podría ofrecer una alternativa en el control del insecto. Si bien la producción de aflatoxinas por parte del género *Aspergillus* ha sido ampliamente documentada sobre todo para *A. flavus*, este no es el caso para *A. parasiticus* en donde la producción de estas toxinas no es frecuente (Drummond y Pinnock 1990). Este resultado es alentador hacia en uso del patógeno a nivel

comercial, pero no asegura que otras cepas vaya a tener el mismo comportamiento. Por lo tanto, este microorganismo debe de ser estudiado a mayor profundidad en este aspecto, con el objeto de asegurar su inocuidad y eficacia.



Figura 3.

**Áfido amarillo de la caña (*Sipha flava*) infectado naturalmente por *Lecanicillium lecanii* (izquierda);
cochinilla harinosa (*Saccharicoccus sacchari*), infectada naturalmente por *Aspergillus parasiticus*.**

Fuente: A. Rodríguez M.

Trichoderma spp es un hongo presente en el suelo, la rizósfera de las plantas y además, puede crecer de forma endófito en las raíces y otros órganos de las plantas. Ejerce control de hongos patógenos de forma indirecta, a través de la competencia por espacio y nutrientes, modificando las condiciones en la zona de la rizósfera (pH), y mediante la promoción de crecimiento vegetal y del mecanismo de defensa de las plantas. De forma directa ejerce control a través del micoparasitismo y la antibiosis, en donde intervienen enzimas que degradan quitina y glucanos (componentes principales de la pared celular de los hongos) y diferentes sustancias de carácter antibiótico, respectivamente (Romao-Dumaresq *et al* 2012).

La aplicación de *Trichoderma* spp en el cultivo de la caña de azúcar, ofrece muchas alternativas para el control de patógenos de naturaleza fúngica. Por ejemplo, *T. viridae*, pero sobre todo *T. harzianum*, han mostrado potencial de control del hongo *Colletotrichum falcatum*, agente causal de la enfermedad de la pudrición roja del tallo, tanto a nivel de laboratorio como en campo, controlando la enfermedad en el 48% de los tallos muestreados, y reduciendo la severidad de la enfermedad en el 53% de los tallos evaluados. *T. viride* permitió el control total de la enfermedad en el 28% de los tallos y redujo la severidad en el 76%. La aplicación de *T. harzianum* y *T. viride* también permitió incrementar la productividad en hasta 10 y 9 t/ha, respectivamente. Se concluye que esta estrategia puede ser utilizada extensivamente con variedades susceptibles y/o

moderadamente resistentes a la enfermedad, para prolongar su vida útil en el campo (Singh *et al* 2008).

Por otra parte, en estudios llevados a cabo en laboratorio y vivero, se demostró el buen potencial de *T. viride*, *T. harzianum* y *T. pseudockei*, como agentes de control biológico de *Phytophthora infestans* y *Fusarium moniliforme*, causantes de la marchitez de la caña de azúcar. Los estudios realizados en macetas con suelo estéril previamente inoculado con los patógenos y posteriormente inoculados con los antagonistas, reflejaron un control total por parte de *T. Viride* y del 95% por parte de *T. harzianum* y *T. pseudokei*. En estos dos experimentos se menciona que el micoparasitismo (parasitismo sobre un hongo), a través de la producción de enzimas líticas (quitinasas y glucanasas), fue el mecanismo de acción utilizado por los hongos antagonistas evaluados (Jena y Panigrahi 2017).

La técnica de aplicación de *Trichoderma* que ha sido más efectiva, es mediante la inoculación de plántulas provenientes de cultivo de tejido, utilizando en concepto de “bioendurecimiento” (también llamado biohardening o biopriming, en inglés) El éxito bajo este sistema se debe a que las plántulas saliendo del laboratorio de cultivo de tejidos, están prácticamente desprovistas de microorganismos a nivel de su rizósfera, por lo que aquellos que son inoculados durante la etapa de aclimatación, rápidamente se apropian del nicho y ejercen las funciones biológicas por las que fueron seleccionados (Bernal *et al* 2008; Mehnaz 2011; Jisha *et al* 2013). Está comprobado que a través de sus raíces, las plantas liberan gran cantidad de exudados que son aprovechados por los microorganismos benéficos en el suelo para colonizarlas y defenderlas de patógenos; esta estrategia de las plantas le consume entre el 10 y el 20% de los productos generados en la fotosíntesis (Patel *et al* 2014).

Por otra parte, aunque los Biofertilizantes como tales no se catalogan como Bioplaguicidas en un sentido estricto, como se explicó, muchos de los microorganismos presentes en éstos tienen también la capacidad de antagonizar con patógenos de muchos cultivos, y la caña de azúcar no es la excepción. Por ejemplo, diferentes bacterias y actinomicetes epifíticos (que crecen en la superficie de los órganos de las plantas, sea en la parte aérea o subterránea), como *Serratia marscens*, *Lactobacillus* sp, *Bacillus* spp, *Pseudomonas fluorescens*, *Glucanacetobacter diazotrophicus* y *Streptomyces* sp, demostraron en experimentos de laboratorio y vivero, ejercer un excelente control de la pudrición roja, permitiendo el 92% de germinación, frente al 12% de germinación en plantas no tratadas con los microorganismos benéficos (Sumana y Singh 2012). Otro reporte interesante a nivel de campo, indicó que la inoculación de plantas de caña con las bacterias *Stenotrophomonas maltophilia* y *Ochrobacterium intermedium*, suprimieron el desarrollo de la pudrición roja (*C. falcatum*) en porcentajes del 52 y 44% (Hassan *et al* 2014).

7. Selección de microorganismos con mayor potencial.

Con base en la información revisada sobre el potencial de diferentes microorganismos benéficos y las necesidades más urgentes en la producción de la caña de azúcar en el país, se seleccionaron 33 microorganismos benéficos con alto potencial de uso en el cultivo. De éstos, a *Bacillus* spp,



Trichoderma spp y *Pseudomonas* spp, son los que aportan más tipos de efectos biológicos benéficos a las plantas, con 5 (15,2%), 4 (12,1%) y 3 (9,1%), respectivamente. No obstante, otros microorganismos con gran potencial en un aspecto específico como *Azospirillum* sp, *Glucanacetobacter diazotrophicus* (FBN), así como algunos hongos y bacterias entomopatógenos, podrían ofrecer también gran potencial. Además los entomopatógenos podrían ampliar las posibilidades de control de otras plagas insectiles de gran importancia económica no consideradas en esta propuesta, como por ejemplo: el salivazo, el barrenador gigante y algunos defoliadores.

En otro ámbito, de acuerdo al tipo de efecto biológico mayormente asociado a los microorganismos preseleccionados, la Biofertilización se destaca con 14 microorganismos asociados a este efecto (42,4%); en segundo lugar, el Control Biológico de Insectos con 10 microorganismos asociados (30,3%); y en tercer lugar, el Control Biológico de Enfermedades y Estrés con 9 (27,3%).

De acuerdo al modo de acción específico o línea de I + D, la FBN y el Control Biológico de Jobotos integran a 7 microorganismos cada uno (21,2%); mientras que el Control Biológico de Enfermedades a través del parasitismo, la antibiosis y la competencia por espacio y nutrientes, integra a 5 microorganismos (15,1%). El cuadro 2 muestra las especies seleccionadas, su efecto biológico y el modo de acción en que actúan.

Cuadro 2.
Microorganismos benéficos preliminarmente considerados a evaluar su potencial en el cultivo de la caña de azúcar.

EFECTO BIOLÓGICO MICROORGANISMO / MODO DE ACCIÓN	BIOFERTILIZACIÓN			C. BIOLÓGICO DE ENFERMEDADES Y ESTRÉS			CONTROL BIOLÓGICO DE INSECTOS			TOTAL / MICRO.
	Reguladores crecimiento	FBN	Solub. P y K	Parasitismo antibiosis, competencia	Resistencia Sistémica Inducida (IRS)	Efecto antiestrés (sequía, salinidad)	Jobotos	Áfido amarillo	Cochinilla harinosa	
<i>Aspergillus parasiticus</i>									X	1
<i>Azospirillum</i> sp	X	X								2
<i>Azotobacter</i> sp	X	X								2
<i>Bacillus</i> spp	X	X	X	X	X					5 (15,2%)
<i>Bacillus popilliae</i>							X			1
<i>B. thuringiensis</i>							X			1
<i>Beauveria bassiana</i>							X	X		2
<i>Beauveria brongniarti</i>							X			1
<i>Beijerinckia</i> sp		X								1
<i>Glucanacetobacter</i> sp		X	X							2
<i>Herbaspirillum</i> sp		X								1
<i>Lecanicillium lecanii</i>								X		1
<i>Metarhizium anisopliae</i>							X			1
<i>Pseudomonas</i> sp			X	X		X				3 (9,1%)
<i>Heterorhabditis</i> sp							X			1
<i>Stenotrophomonas</i>		X		X						2
<i>Steinernema</i> sp							X			1
<i>Serratia</i> sp				X						1



<i>Trichoderma</i> spp			X	X	X	X				4 (12,1%)
TOTAL/ MODO ACCIÓN	3	7	4	5	2	2	7	2	1	33
%	9,1	21,2	12,1	15,1	6,1	6,1	21,2	6,1	3	100,0
TOTAL/ EF. BIOLÓG.	14			9			10			33
%	42,4			27,3			30,3			100,0

8. Propuesta de proyectos de I + D en insumos biotecnológicos con efecto biofertilizante y bioplaguicida.

Los proyectos específicos, su objetivo principal y duración, se detallan en el cuadro 3.

Cuadro 3.
Propuesta de proyectos de I + D en insumos biotecnológicos con efecto biofertilizante y bioplaguicida.

PROYECTO	Objetivo	AGENTES BIOLÓGICOS
Bio-endurecimiento de material de siembra (vitroplantas y yemas).	Establecer viveros primarios con material de siembra de alto vigor y resistencia al ataque de plagas y enfermedades.	Bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) y de resistencia sistémica inducida (RSI), hongos antagonistas a patógenos (<i>Trichoderma</i> spp),
Biofertilización de la caña de azúcar.	Reducir la necesidad de aplicar fuentes químicas de NPK, mejorando la rentabilidad y sostenibilidad de la operación agrícola.	Bacterias fijadoras de Nitrógeno y solubilizadoras de Fósforo y Potasio.
Control biológico del áfido amarillo (<i>Sipha flava</i>)	Poner a disposición un agente biológico de alta eficacia para el combate del insecto.	<i>Lecanicillium lecanii</i> , <i>Beauveria bassiana</i> .
Control biológico del joboto (<i>Phyllophaga</i> spp)	Desarrollar un producto biológico altamente eficaz contra el insecto en su fase larval, contribuyendo al Manejo Integrado de la plaga (MIP).	<i>Bacillus popillae</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>Beauveria brongniarti</i> , <i>B. bassiana</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> .
Control biológico de la cochinilla harinosa (<i>Saccharicoccus sacchari</i>)	Identificar el potencial de <i>Aspergillus parasiticus</i> y su potencial para producir aflatoxinas.	<i>Aspergillus parasiticus</i>

9. Mecanismo para el aislamiento y conservación de los microorganismos de interés.

9.1. Tipo de muestra.

Las muestras a tomar para el aislamiento de los diferentes microorganismos de interés, provienen de tres fuentes: tejido interno de la raíz, tallo u hojas (microorganismos endófitos), suelo rizosférico (microorganismos rizosféricos) y suelo extra rizosférico. La figura 4 muestra los tipos de muestra y los grupos de microorganismos esperados a encontrar en cada uno de ellos.

Una vez tomadas las muestras, éstas son trasladadas al laboratorio (dentro de hieleras), en donde una sección representativa de cada una, será suspendida en solución salina estéril y diluida repetidamente.

9.2. Medios de cultivo y técnicas para el aislamiento.

Para obtener BFN aerobias y aéreas facultativas (*Bacillus* spp, *G. diazotrophicus*) y bacterias anaeróbicas o microaerofílicas (*Azospirillum* sp, *Herbaspirillum* sp, *Serratia* sp), se utilizan medios de cultivo agarizados (Burk's, LG y agar nutriente) y semisólidos (*Azospirillum* broth, NFB y JNFB), respectivamente. La característica común de estos medios de cultivo, es que no deben contener Nitrógeno en su composición, de tal forma que su aprovisionamiento, provenga de la atmosfera interna de las placas Petri, o del Nitrógeno disuelto en la columna de los tubos de ensayo, para el caso de las bacterias microaerofílicas (Figura 5).

Una vez formadas las colonias en agar, o bien, los agregados o velos en los tubos de ensayo, se seleccionan los diferentes morfotipos y se reaislan en los mismos medios de cultivo. Una vez puras las colonias, son sometidas a estudios básicos para caracterizar su morfología y algunos atributos fisiológicos, y así determinar preliminarmente, si cumplen con las características típicas de los microorganismos de interés. La conservación de los aislamientos se realizará utilizando la técnica de crio-preservación dentro de viales a -80°C , lo que asegura la viabilidad de hongos y bacterias a largo plazo (hasta 10 años).

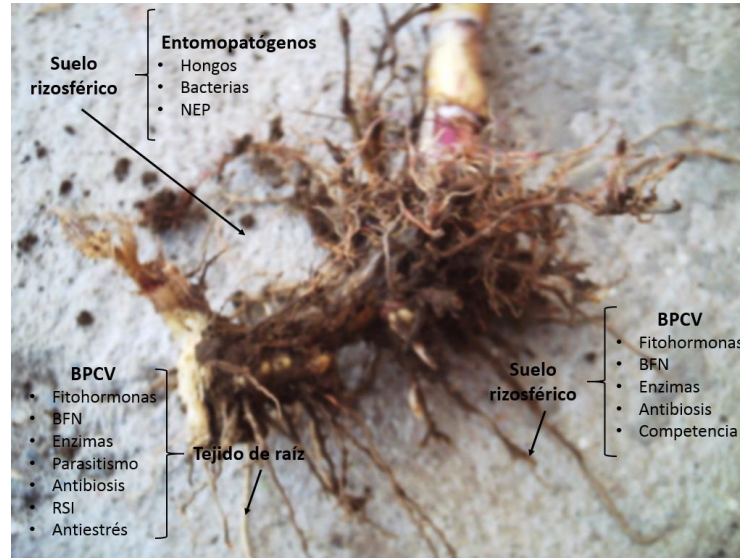


Figura 4.

Tipos de muestra a recolectar para el aislamiento de diferentes microorganismos benéficos.

Fuente: <http://pastosyforrajesieavm.blogspot.com/2009/11/cana-de-azucar.html>. Adaptada por A. Rodríguez M.

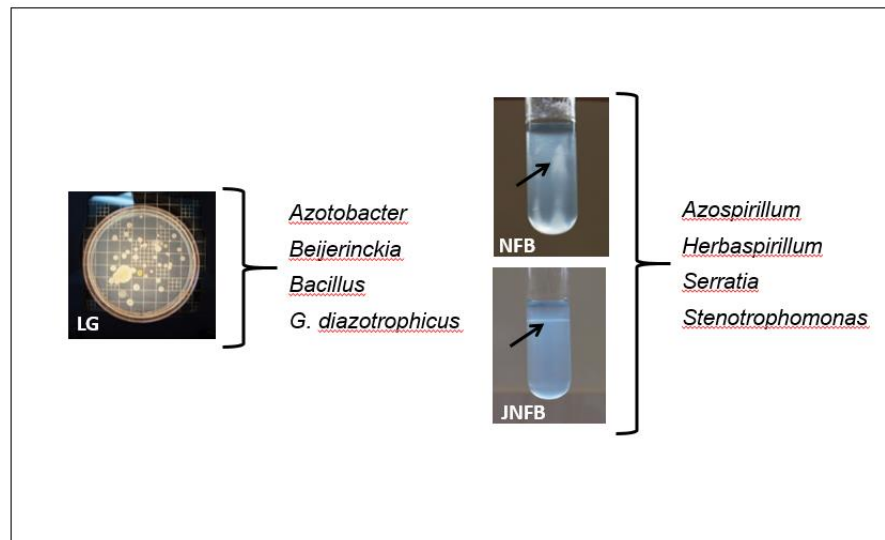


Figura 5.

Tipos de medios de cultivo agarizados (izquierda) y semisólidos (derecha) utilizados en el aislamiento de bacterias fijadoras de Nitrógeno (BFN). Nótese

Fuente: A. Rodríguez M.

El aislamiento de hongos y nematodos entomopatógeno se realizará a partir de suelo extrarizosférico, utilizando la técnica del insecto cebo (Bedding y Akhurst 1975, adaptada por el autor) con larvas de *Galeria mellonella* (LEP: pyralidae), las cuales son fácilmente infectables

con este tipo de microorganismos. Las larvas de 1,5 a 2 cm de longitud son previamente tratadas con agua a 56°C y luego de un período de recuperación, son colocadas sobre la muestra de suelo a partir de la cual se pretende aislar a los hongos y nematodos entomofílicos. El procedimiento se muestra en la figura 6. Para el aislamiento de *Bacillus* spp, se aplicará la pasteurización de las muestras (30 minutos a 65°C y 30 minutos a 0°C) y posterior siembra de una alícuota diluida en medio agar nutriente. La pasteurización elimina las bacterias que no producen estructuras de resistencia como las endosporas típicas de *Bacillus* spp (Rodríguez 2014).

La obtención de *Trichoderma* spp se realiza de igual forma utilizando un cebo o sustrato muy fácilmente colonizable por el hongo, el cual se introduce dentro de una bolsita o “sachet”, y se entierra en el sitio de donde se pretende obtener el aislamiento, por espacio de 8 a 15 días. Transcurrido ese tiempo, el material colonizado es suspendido en solución salina estéril y posteriormente se inocula en un medio específico para hongos (PDA + pH 5,3). Luego de un período de incubación de 4 a 5 días, se reaislan las colonias fúngicas de color verde - musgo, verde - azulado o verde amarillento típicas de las diferentes especies del hongo (Figura 7).



Figura 6.

Técnica del insecto cebo con *Galleria mellonella* (LEP: pyralidae). Larva parasitada por *Metarhizium anisopliae* (izquierda), larva parasitada por *Heterorhabditis bacteriophaga* (centro), larva sana y parasitada por *Steinernema carpocapsae* (derecha).

Fuente: A. Rodríguez M.



Figura 7.

Cebo enriquecido para la colonización y aislamiento del hongo *Trichoderma spp* (izquierda) y colonia típica del hongo (derecha).

Fuente: A. Rodríguez M.

9.3. Proceso de selección de candidatos.

El proceso de selección de los microorganismos deberá realizarse mediante la implementación de protocolos específicos para cada línea de investigación. Para el caso de las BPCV, las pruebas involucran: a) El diseño de medios de cultivo para escalarlas (reproducirlas) sin que pierdan sus facultades; b) La selección a nivel de vivero con vitroplantas o yemas, en donde se evalúa el efecto de los microorganismos sobre las principales variables de respuesta (altura de la planta y largo de la raíz, peso fresco y seco de los órganos de la planta, número de hojas, etc.); c) El diseño de una formulación con un acarreador o vehículo que proteja al microorganismo de los factores bióticos y abióticos mientras coloniza la rizósfera o infecta la raíz); y d) Experimentos en campo en parcelas experimentales, semi-comerciales y a nivel comercial, en donde se valora la respuesta hacia las principales variables de agroindustriales del cultivo. Como se indicó oportunamente, esta investigación debe de realizarse sobre las principales variedades a nivel comercial y debe de incluir un estricto monitoreo de la incidencia y severidad de los principales patógenos que afectan al cultivo (cogollo retorcido, marchitez, pudrición roja, roya, etc.).

En el caso del Control Biológico de Insectos, la investigación debe de iniciar en el laboratorio, siempre y cuando sea posible acondicionar al insecto en esa condición, sin que sufra estrés y muera por otras causas que no sea el efecto del patógeno que se está evaluando. El laboratorio ofrece condiciones controladas que permiten visualizar de forma precisa, las variables de respuesta: Virulencia y Agresividad, principalmente. Los estudios iniciales deben complementarse con la evaluación de la eficacia del sistema de escalamiento, pues no



necesariamente este se adapta a los requerimientos de todos los microorganismos, existiendo la posibilidad de necesitar condiciones especiales.

La primera selección se hace con base en los resultados de escalamiento y patogenicidad en el laboratorio. Posteriormente, se realizan estudios a nivel de vivero que ofrecen información sobre el efecto de las condiciones bióticas y abióticas, y sobre el desempeño de los patógenos. Los estudios finales se concentran en mejorar la formulación (granulada, polvo mojable, emulsión concentrada, etc.), pensando en incrementar la viabilidad, permanencia y colonización del agente a nivel de campo. Estas evaluaciones junto con el potencial de control en campo, deben hacerse en parcelas homogéneas, pero adecuadamente aisladas para evitar el traslape de los tratamientos. Una vez identificado el potencial de algún aislamiento, los estudios se concentran en evaluar su desempeño a escala semicomercial y comercial, así como en determinar la rentabilidad del programa.

En todos los casos, una vez identificado el potencial de determinado producto biotecnológico a escala comercial, debe implementarse un sistema que proteja la invención y la inversión realizadas (secreto industrial, patente, marca comercial, u otro); paralelamente, debe plantearse los costos y eventuales socios para diseñar un producto con las características para ser comercializable a gran escala comercial y además, el producto debe registrarse según el reglamento que aplique. La figura 8 esquematiza el proceso de selección de los microorganismos benéficos. Nótese en la figura 8 que cada pequeño cuadrado con la letra "S" y un número, significa que en esa etapa se aplica una selección o tamizaje, que va reduciendo el número de agentes biológicos, seleccionando a los de mayor potencial.

determinar la cercanía de los aislamientos obtenidos, con las características típicas de los microorganismos aislados.

- 10.4. Asegurar la calidad del inóculo producido para realizar los bioensayos a nivel de laboratorio, vivero y campo.
- 10.5. A nivel de vivero, implementar técnicas que favorezcan la colonización inicial de los agentes biológicos aplicados como el biopriming o bioendurecimiento.
- 10.6. Realizar la identificación molecular de los candidatos de mayor potencial luego de haber sido estudiados en laboratorio y vivero. Utilizar la información para descartar microorganismos reportados como perjudiciales para la salud.
- 10.7. Utilizar el diseño estadístico ideal, con el número de repeticiones adecuado, y aplicar las pruebas estadísticas necesarias para comprobar y medir las variables de respuesta más robustas. Todo esto permitirá comprobar o refutar la hipótesis planteada, con un alto nivel de seguridad.
- 10.8. Desarrollar formulaciones y estrategias de aplicación que permitan asegurar la viabilidad prolongada de los agentes biológicos inoculados a nivel de campo. Implementar un sistema de monitoreo que permita corroborarlo.

11. Conclusión.

La naturaleza ofrece soluciones para los múltiples problemas fitosanitarios del cultivo de la caña de azúcar, por lo que aprovechando el conocimiento adquirido sobre las propiedades de los microorganismos benéficos y los avances biotecnológicos que permiten reproducirlos y formularlos, se presentan oportunidades para desarrollar insumos biológicos para complementar y reducir la dependencia hacia el uso de agroquímicos, y a la vez, brindarle al cultivo una mayor sostenibilidad técnica y ambiental, satisfaciendo así las cada vez más exigentes demandas de los consumidores y los mercados alrededor del mundo.

12. Literatura citada.

1. Becerra de Armas, E.; Lugo-Ruiz, I.; Más-Martínez, R.; Pineda-Ruíz, E.; Viñas-Quintero, Y. 2014. ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar 48(3): 49-53.
2. Bedding, RA.; Akhurst, RJ. Short communications: A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. Nematologica 21: 109-116.
3. Bernal, A.; Machado, P.; Carmona, ER.; Rivero, O.; Cortegaza, L.; Cabrera, M.; Zayas, CM.; Nodarse, O.; Santana, I.; Arencibia, AD. 2008. Priming and biopriming integrated into the sugarcane micropropagation technology by temporary immersion bioreactors (Tibs). Sugar Tech 10(1): 42-47.

4. Bhattacharjee, R.; Dey, U. 2014. Biofertilizer, a way towards organic agriculture: A review. *African Journal of Microbiology Research* 8(24): 2332-2342.
5. Bixby, A.; Alm, SR.; Power, K.; Grewal, P.; Swier, SR. 2014. Susceptibility of four species of turfgrass-infesting Scarabs (Coleoptera: Scarabaeidae) to *Bacillus thuringiensis* Serovar *japonensis* Strain Buibui. *Journal of Economic Entomology* 100(5): 1604-1610.
6. Chelvi, CT.; Thilagaraj, WR.; Nalini, R. 2011. Field efficacy of formulations of microbial insecticide *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) for the control of sugarcane white grub *Holotrichia serrata* F (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Biopesticides* 4(2): 186-189.
7. Damalas, C.; Koutroubas, SD. 2018. Current status and recent developments in biopesticide use. *Agriculture*. P 8-13.
8. Da Silva, JM.; Carvalho dos Santos, TM.; Santos de Albuquerque, L.; Coentro-Montaldo, Y.; Lima de Oliveira, JU.; Mesquita da Silva, SG.; Silva-Nascimento, M.; Oliveira-Teixeira, RR. 2015. Potential of endophytic bacteria (*Herbaspirillum* spp. And *Bacillus* spp) to promote sugarcane growth. *Australian Journal of Crop Science* 9(8): 754-760.
9. Drummond, J.; Pinnock, DE. 1990. Aflatoxin production by entomopathogenic isolates of *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus flavus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 55(3): 332-336.
10. Drummond, J.; De Barro, PJ.; Pinnock, DE. 1991. Field and laboratory studies on the fungus *Aspergillus parasiticus*, a pathogen of the pink sugar cane mealybug *Saccharococcus sacchari*. *Biological control* 1(4): 288-292.
11. Espejo-Herrera, N¹; Gracia-Lavedan, E; Boldo, E.; Aragonés, N.; Pérez-Gómez, B.; Pollán, M.; Molina, AJ.; Fernández, T.; Martín, V.; La Vecchia, C.; Bosetti, C.; Tavani, A.; Polesel, J.; Serraino, D.; Gómez-Acebo, I.; Ardanaz, E.; Pisa, F.; Fernández-Tardón, G.; Tardón, A.; Peiró, R.; Navarro, C.; Castaño-Vinyals, G.; Moreno, V.; Aggazzotti, G.; Basagaño, X.; Nieuwenhuijsen, M.; Kogevinas, M.; Villanueva, CM. 2016. Colorectal cancer risk and nitrate exposure through drinking water and diet. *Environ Heath Perspect* 139(2): 334-346.
12. Espejo-Herrera, N².; Gracia-Lavedan; E.; Pollan, M.; Aragonés, N.; Boldo, E.; Pérez-Gómez, B.; Altzibar, JM.; Amiano, P.; Zabala, AJ.; Ardanaz, E.; Guevara, M.; Molina, AJ.; Barrio, JP.; Gómez-Acebo, I.; Tardón, A.; Peiró, R.; Chirlaque, MD.; Palau, M. Muñoz, M.; Font-Ribera, L.; Castaño-Vinyals, G.; Kogevinas, M.; Villanueva, CM. Ingested Nitrate and Breast Cancer in the Spanish Multicase-Control Study on Cancer (MCC-Spain). *Environ Health Perspect*.124(7):1042-9.
13. Ferreira da Silva, S.; Lopes-Olivares, F.; Pasqualotto-Canellas, L. 2017. The bioestimulant manufactured using diazotrophic endophytic bacteria and humates is effective to increase sugarcane yield. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 4(24): 1-6.

14. Girón-Pablo, S.; Ruiz-Vega, J.; Pérez-Pacheco, R.; Ortiz-Hernández, YD.; Aquino-Bolaños, T. 2015. Biological control of *Phyllophaga vetula* (Horn), and lethal concentrations and times of entomopathogenic nematodes. *Southwestern Entomologist* 40(2): 292-296.
15. Grewal, PS.; Power, KT.; Grewal, SK.; Suggars, A.; Haupricht, S. 2004. Enhanced consistency in biological control of white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) with strains of entomopathogenic nematodes. *Biological Control* 30(1): 73-82.
16. Hassan, MN.; Aghan, S.; Hassan, Z.; Hafeez, FY. 2014. Biopesticide activity of sugarcane associated rhizobacteria: strain NH-5 and *Stenotrophomonas maltophilia* strain NH-300 against red rot under field conditions. *Phytopathología Mediterranea* 53(2): 229-239.
17. Jisha, KC; Vijayakumari. K; Puthur, JT. 2013. Seed priming for abiotic stress tolerance: an overview. *Acta Physiol Plant* 35: 1381-1396.
18. Köhl, J.; Postma, J.; Nicot, P.; Ruocco, M.; Blum, B. 2011. Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria. *Biological Control* 57(1): 1-12.
19. Koppenhöfer, AM.; Choo, HY.; Kaya, HK.; Lee, DW.; Gelernter, WD. 1999. Increased field and greenhouse efficacy against scarab grubs with a combination of an entomopathogenic nematode and *Bacillus thuringiensis*. *Biological Control* 14(1): 37-44.
20. Koppenhöfer, AM.; Grewal, PS.; Fuzy, EM. 2006. Virulence of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis zealandica*, and *Steinernema scarabaei* against five white grubs species (Coleoptera: Scarabaeidae) of economic importance in turfgrass in North America. *Biological Control* 38(3): 397-404.
21. Kunar-Pindi, P.; Satyanarayana, SDV. 2012. Liquid microbial consortium- A potential tool for sustainable soil health. *Journal of Biofertilizers & Biopesticides* 3(4): 1-9.
22. Martínez-Hernández, A.; Alatorre-Rosas, R.; Guzmán-Franco, AW.; Rodríguez-Leyva, E. 2015. Effect of dual inoculation with nematodes and fungal pathogens on the survival of *Phyllophaga polyphylla* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *Biocontrol Science and Technology* 25(11): 1221-1232.
23. Mehnaz, S. 2011. Plant Growth-Promoting Bacteria Associated with Sugarcane. IN *Bacteria in Agrobiolgy: crop systems*. Maheshwari, DK. (ed). Department of Microbiology and Molecular Genetics, University of the Punjab, Quaid-i-Azam Campus, Lahore, Pakistan.
24. Nájera-Rincón, MB.; García-Martínez, M.; Crocker, RL.; Hernández-Velázquez, V.; Rodríguez del Bosque, LA. 2005. Virulencia de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, nativos del occidente de México, contra larvas de tercer estadio de *Phyllophaga crinita* (Coleoptera: Melolonthidae), bajo condiciones de laboratorio. *Fitosanidad* 9(1): 33-36.

25. Nandita, J.; Panigrahi, MR. 2017. Rhizobacteria and *Trichoderma* spp – The potential Bio-control Agentes against sugarcane wilt pathogens. International Journal of Research in Engineering and Applied Sciences (IJREAS) 7(10): 1-9.
26. Olson, S. 2015. An Analysis of the Biopesticide Market: Now and Where it is Going. Outlook on Pest Management 26(5): 203-206.
27. Pardey, AEB. 2011. Parasitoides, Predadores y entomopatógenos que afectan las plagas de la caña de azúcar en Colombia. Documento de trabajo N°719. Programa de Variedades, Área de Entomología. Centro de Investigaciones en Caña de Azúcar (CENGICAÑA), Cali, Colombia. Disponible en línea: http://www.cenicana.org/pdf_privado/no_clasificacion/6481.pdf
28. Patel, M.; Seth, U.; Haleja, P.; Joshi, B.; Animasaun, DA. 2014. Isolation and diversity analysis of rhizobacteria from sugarcane and ints biocontrol potential against *Rhizoctonia solani* – A common plant pathogen. International of Current Microbiology and Applied Sciences 3(12): 69-76.
29. Pelaez, V.; Mizukawa, G. 2017. Diversification strategies in pesticide industry: from seed to biopesticides. Ciencia Rural 47(2): 1-6.
30. Pineda-Castellanos, ML.; Rodríguez-Segura, Z.; Villalobos, JF.; Hernández, L.; Lina, L.; Núñez-Valdez, ME. 2015. Pathogenicity of isolates of *Serratia marcescens* towards larvae of the scarab *Phyllophaga blanchardi* (Coleoptera). Pathogens 4(2): 210-228.
31. Rakshit, A.; Sunita, K.; Pal, S.; Singh, A.; Bahadur-Singh, H. 2015. Bio-priming mediated nutrient use efficiency of crop species. In Rakshit *et al* (eds.). Nutrient use efficiency: from basis to advances. Varanasi, India. Department of Microbiology and Plant Pathology, Institute of Agricultural Science. P. 181-191.
32. Rivera-Urbalejo, AP.; Rodríguez-Andrade, O.; Morales-García, YE.; Quintero-Hernández, V.; Muñoz-Morales, Carbajal-Armenta, A.; Romero-Navarro, E.; Ramos AJ.; Muñoz-Rojas, J. 2017. Inoculación de Plántulas micropropagadas de caña de azúcar con bacterias benéficas para potenciar su producción. Alianzas y Tendencias 2(7): 15-26.
33. Rodríguez-Morales, A. 2014. Evaluación del efecto de cepas nativas de *Bacillus* sp, aisladas de un suelo supresivo a nemátodos, sobre el nematodo barrenador banano, *Radopholus similis* (Thorne), y el crecimiento de plantas de banano (*Musa AAA*) bajo condiciones de vivero” Tesis para optar por el título de Máster en Gestión de Recursos Naturales y Tecnologías de Producción. Instituto Tecnológico de Costa RICA. Cartago, Costa Rica. 204 p.
34. Romao-Dumaresq, AS.; de Araujo, LW.; Talbot, NJ.; Thronton, CR. 2012. RNA interference of endochitinases in sugrcane endophyte *Trichoderma virens* 223 reduces its fitness as a biocontrol agent of pineapple disease. PLOS ONE 7(10).
35. Rosenstock, TS.; Lipzin, D.; Six, J.; Tomich, TP. 2013. Nitrogen fertilizer use in California: Assesing the data, trends and a way forward. California Agriculture 67(1): 68-79.

36. Serna-Cock, L.; Arias-García, C.; Valencia-Hernández, LJ. 2011. Biofertilización: Una alternativa al uso de fertilizantes químicos en caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). Alimentos Hoy 20(24): 69-82.
37. Singaravelu, B. Crickmore, N.; Srikanth, J.; Hari, K.; Sankaranarayanan, C.; Nirmala, R.; Radesh-Krishnan, SR.; Meghna, M. 2013. Prospecting for scarabid specific *Bacillus thuringiensis* crystal toxin *cry8* gene in sugarcane ecosystem of Tamil Nadu, India. Journal of Sugarcane Research 3(2): 141-144.
38. Singh, A.; Shukla, N.; Kabadwal, BC.; Tewari, AK.; Kumar, J. 2018. Review on plant - *Trichoderma* -pathogen interaction. International Journal of Current Microbiology and Applied Science 7(2): 2382-2397.
39. Singh, V.; Srivastava, SN.; Ji-Lal, R.; Awashthi, SK.; Joshi, BB. 2008. Biological control of red rot disease of sugarcane through *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride*. Indian Phytopath 61(4): 486-491.
40. Srikanth, J.; Easwarammoorthy, S.; Jalali, SK. 2016. A 100 years of biological control of sugarcane pests in India: review and perspective. CAB Reviews 11(13): 1-17.
41. Subirós-Ruiz, JF. 2011. Experiencias con fertilización biológica en caña de azúcar, Azucarera El Viejo, Guanacaste, Costa Rica. In Memoria XVIII Congreso Azucarero Nacional ATACORI "Lic. Teresita Rodríguez Salas (+). Asociación de Técnicos Azucareros de Costa Rica (ATACORI). San José, Costa Rica.
42. Sumana, A.; Singh, P. 2012. Evaluation of epiphytic microflora and antagonists of red rot pathogen, *Colletotrichum falcatum* in sugacane under subtropical conditions. Journal of Biological Control 26(4): 351-360.
43. Vejan, P.; Abdullah, R.; Khadiran, T.; Ismail, S.; Nasrulhaq-Boyce, A. 2016. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability – A review. Molecules 21(573): -17.
44. Velasco-Velasco, J. Los biofertilizantes y la producción de caña de azúcar (*Saccharum* spp). 2014. AGRO Productividad. P. 60-64.