



# Aplicaciones de Biotecnología para el Desarrollo Agropecuario desde la Empresa Privada.

**Gerencia de Operaciones Agrícolas - Gerencia de Campo - Agronomía - Departamento de Biotecnología**

**Ing. Guillermo Ramirez Ch.; Ing. Juan P. Erazo; Ing. Reinaldo Meneses S.; Lic. Angela M. Fuentes; Lic. Prudencia E. Guevara; Lic. Silvia C. López; Ing. Heidi M. Hernández & Dr. Abby S. Guerra.**

**Mayo 2018**





LAB



Biotechnología

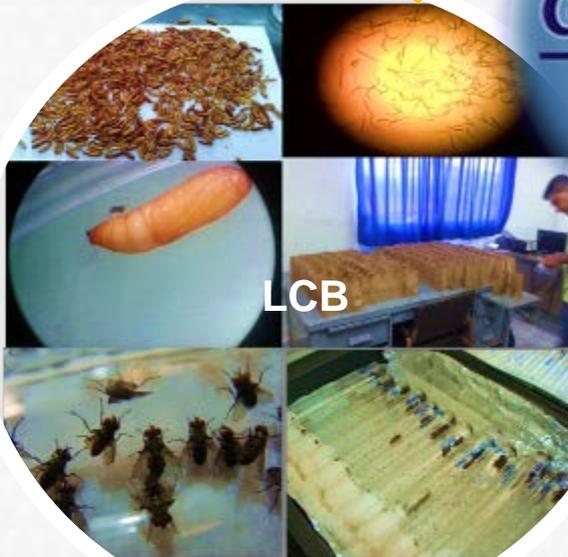


Biotechnología



Grupo Calesa

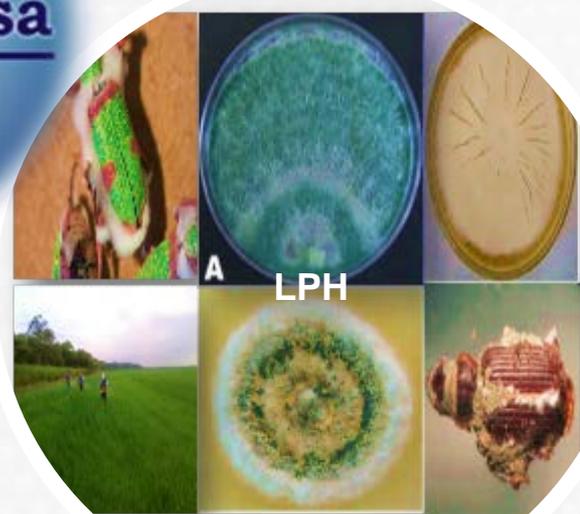
HACIENDA LA ESTRELLA



LCB



Biotechnología



LPH



Grupo Calesa

# **Biotecnología al Servicio de la Agricultura**

## ❖ **Laboratorio de Biotecnología**

1. *Biofábrica - Vitroplantas certificadas*
2. *Diagnostico Molecular por PCR de Enfermedades*
3. *Producción de Bacterias benéficas para Caña de Azúcar*

## ❖ **Laboratorio de Control Biológico**

1. *Producción de Insectos y Nematodos - controladores biológicos de Diatraea sp, Telchin licus, Aenolamia sp y otros.*

## ❖ **Laboratorio de Producción de Hongos**

1. *Hongos Entomopatógenos*
2. *Hongos Micoparásitos*

# Etapas de la Micropropagación

## Ex vitro



Banco de Donantes



Siembra directa en campo



Aclimatación



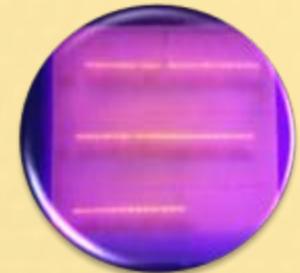
Ápices Meristemáticos



## In vitro Biofábrica



Test de bacterias



Diagnóstico Molecular



Prop. Conv



BITs



## Etapa 0

## Selección del Material Vegetal



## Etapa 1

## Establecimiento *In Vitro*



## Etapa 1      Diferenciación y Crecimiento del Ápice



## Etapa 2      Testaje y Certificación por PCR



## Etapa 3      **Micropropagación Convencional**



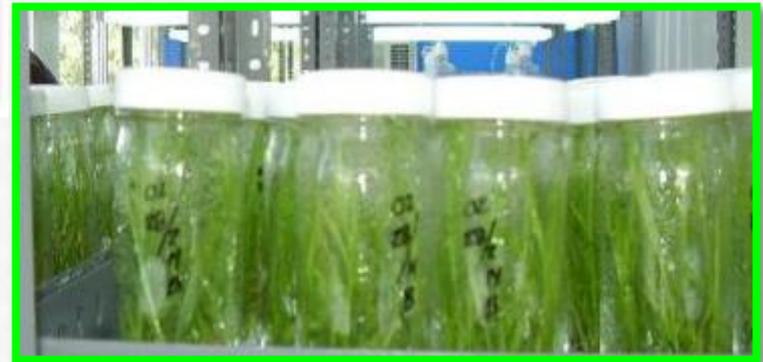
Cámara de Flujo Laminar

Trabajos Asépticos en  
Cámara de Flujo, con el fin  
de evitar contaminaciones



Plantas Diferenciadas  
para Separar (subcultivo)

Plantas en Crecimiento



# Etapa 4      Biorreactores de Inmersión Temporal BIT



Selección de Cluster



Inoculación de Cluter en BITs



BITs ensamblado



BITs elongados y enraizados

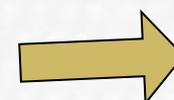


Primera fase de BITs

## Etapa 5      Enraizamiento de Vitroplantas



**Enraizamiento en Biorreactores de Inmersión Temporal**



**Plantas listas para transplante**

## Etapa 6    **Transplante y Aclimatación**



**Sistemas de enraizado**



**Siembra en Sustrato**



**Aclimatación bajo Zarán**



**Vitroplantas de 2 meses  
Izq. y de 22 días Der.**

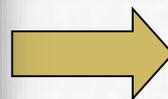


**Aclimatación Directa**

## Etapa 7    Transplante de Plántulas a Campo



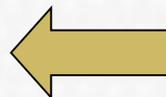
**Plantas Endurecidas**



**Transplante**

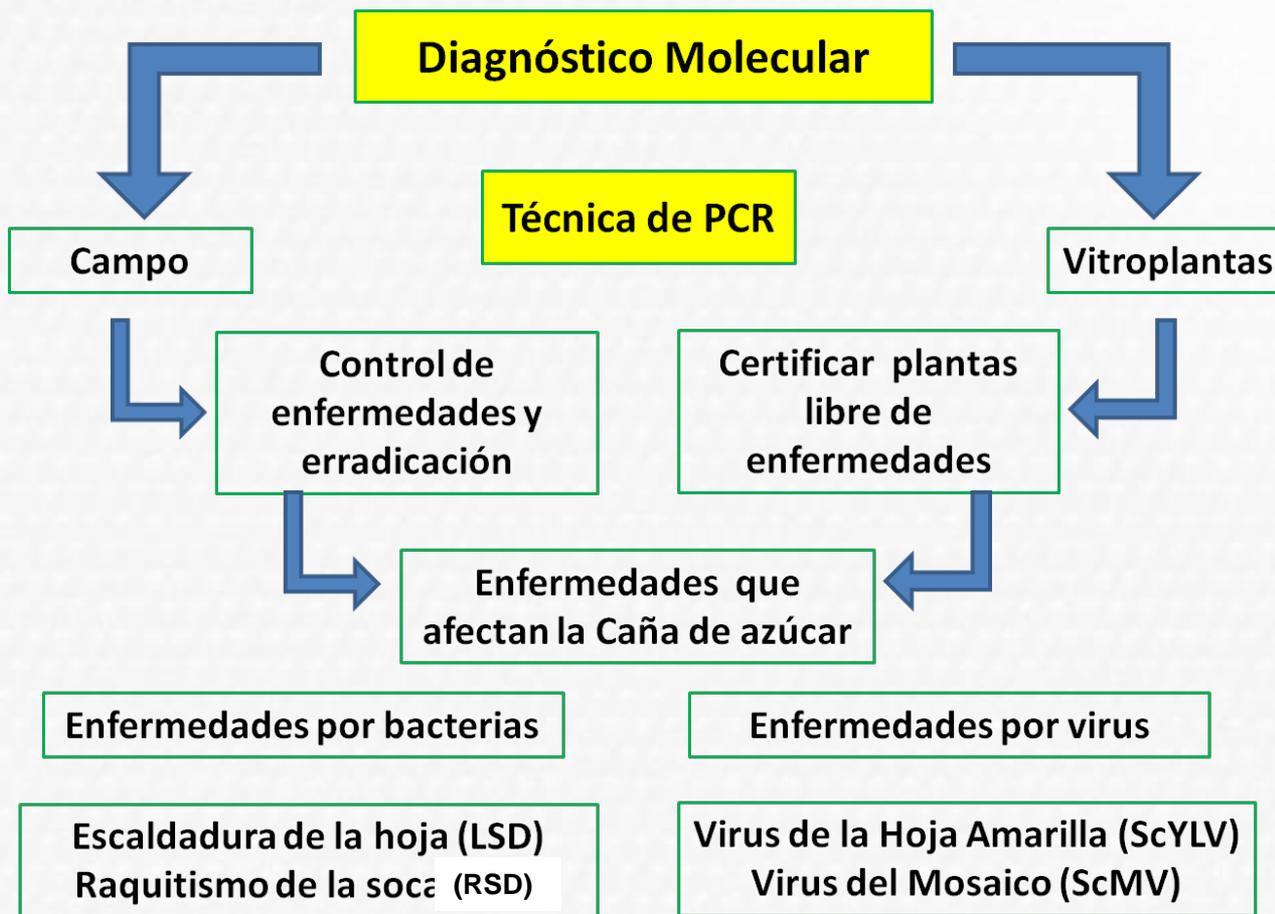


**Plantas de 3 Meses**



**Plantas Recién Sembradas**

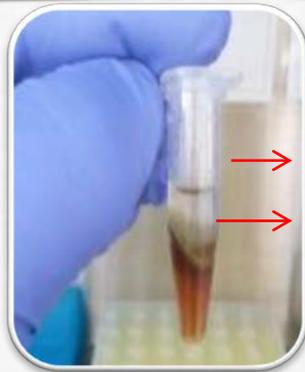
# Diagnóstico Molecular



# Proceso en Laboratorio de PCR



Materiales en la Cámara de extracción de gases



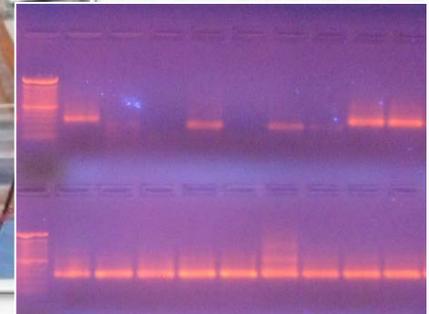
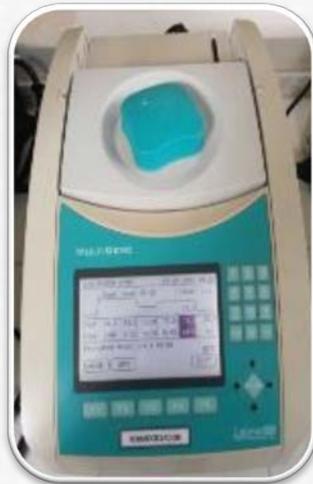
Separación de Fases

## Extracción de ADN y ARN

Fase acuosa (ADN y ARN)  
Fase Orgánica (Proteínas)



## Resultados mediante PCR



Electroforesis  
Diagnóstico Molecular

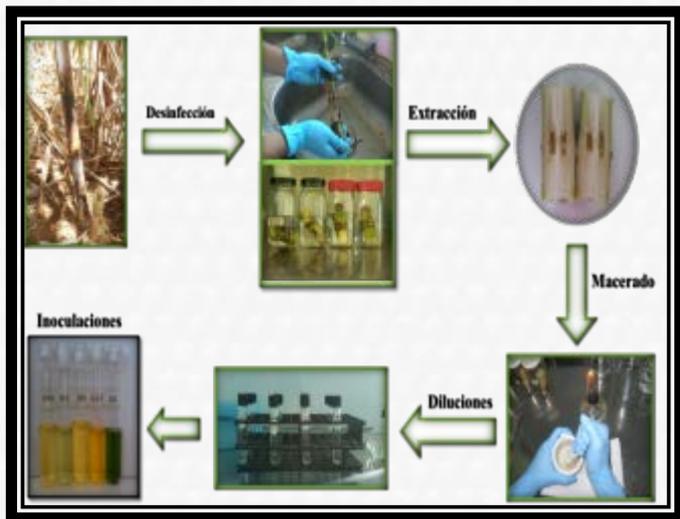


# Producción de Bacterias Endófitas

# METODOLOGÍA DE AISLAMIENTO

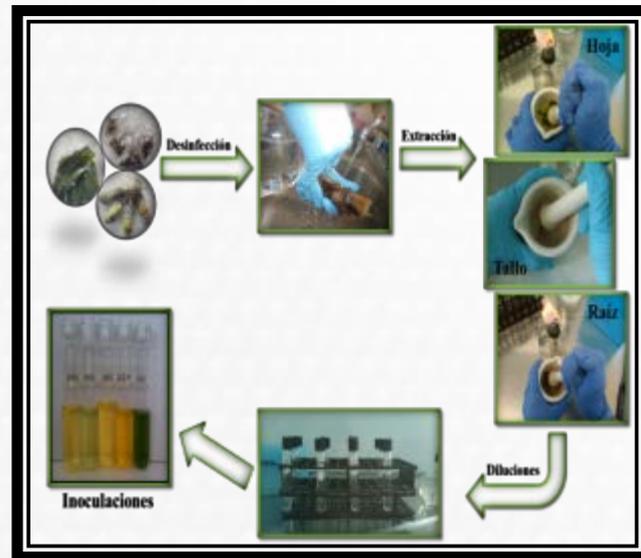
## NUDOS Y ENTRENUDOS

1.



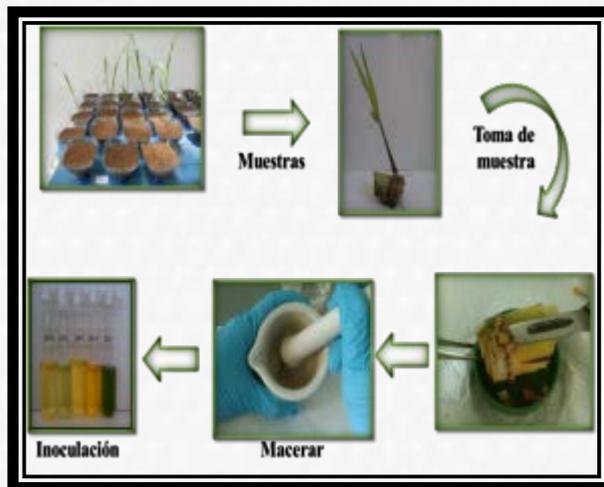
## TEJIDOS DE CAÑA DE AZÚCAR (HOJAS TALLOS Y RAÍCES)

2.



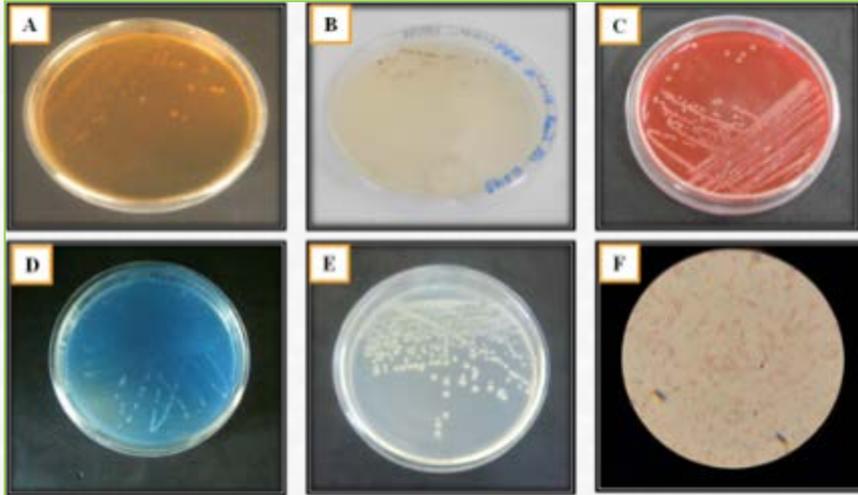
## YEMAS GERMINADAS

3.

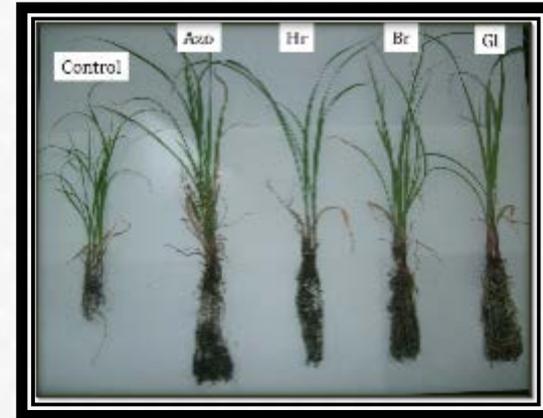


# Bacterias Endófitas

## ENSAYO EN INVERNADERO

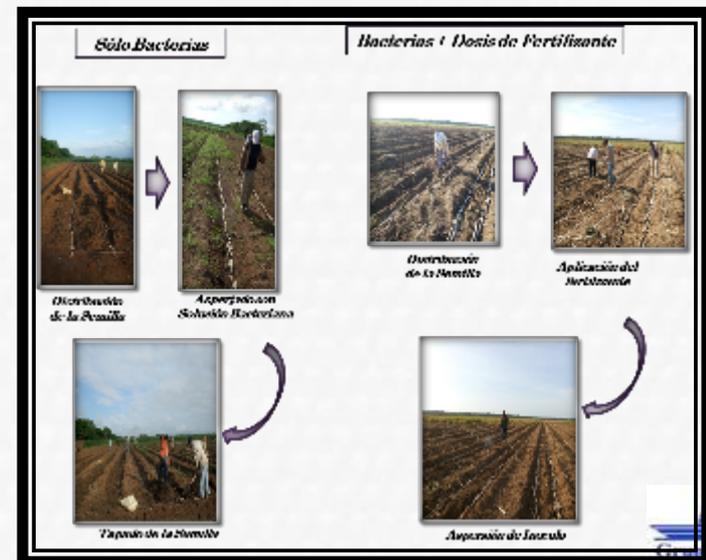


Bacterias endófitas cultivadas en medios sólidos semi-específicos. **A.** *Gluconacetobacter* spp en medio LGI-P; **B.** *Gluconacetobacter* spp en medio PDA; **C.** *Azospirillum* spp en medio Rojo Congo; **D.** *Herbaspirillum* spp en medio JNFb; **E.** *Burkholderia* spp en medio JMV; **F.** Tinción de Gram (Cepa G625-Y2).



Las imágenes muestran cada una de las plantas inoculadas con las diferentes cepas de CALESA y su control (izquierda)

## APLICACIONES EN CAMPOS EXPERIMENTALES



# Producción y Aplicación de Bacterias Endófitas

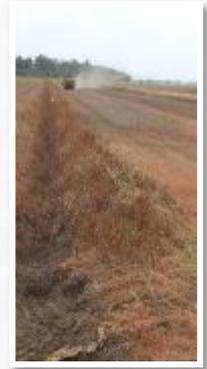
## Inoculación en Caña Planta



Inoculación -Soca o Retoño



## Inoculaciones en Campos Comerciales de Arroz



# Resultados de Aplicaciones – Bacterias Endófitas

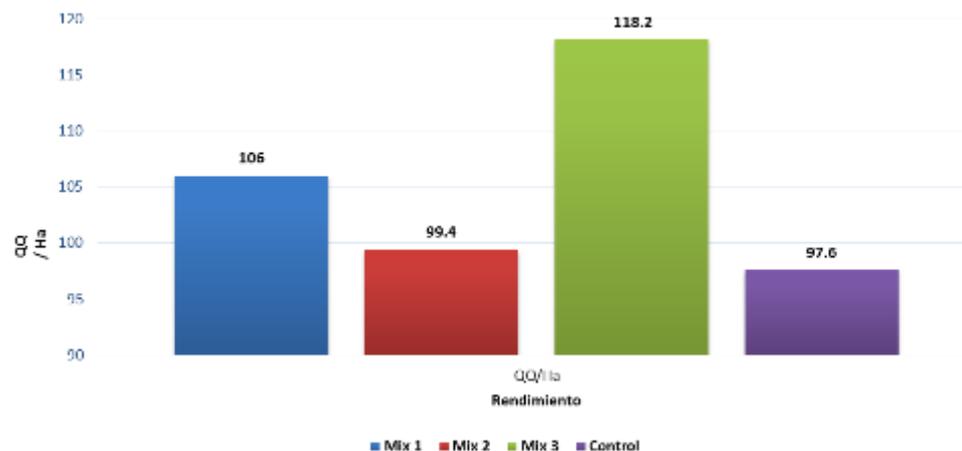
Ton/ha de Campos con Aplicación de Bioproducto.



Ensayos CALESA 2016 - 2017

Variables	Cantidad
Diferencia TCH Total	58.80
Numero de campos	8
Promedio por campo TCH	7.35
Diferencia TCH	7.35
Total Has	151.84
Total Ton	1116.08
TESTIGO TCH PROMEDIO	93.16
TRATAMIENTO TCH PROM.	100.51
% Incremento	7.89%

Evaluación de Uso de Bacterias Endofitas en Arroz CALESA - CEGRACO\_Marzo 2016



En CALESA para 2017 – 2018, se están haciendo evaluaciones con reducción de fertilizante químico.

Tratamiento	QQ/ha	% Incremento
Mix 1	106	109%
Mix 2	99.4	102%
Mix 3	118.2	121%
Control	97.6	





# Laboratorio de Control Biológico - LCB

# Medios Biológicos y Plagas en Caña de Azúcar

## Medios Biológicos

## Plaga

***Lixophaga diatraeae***

120 Adultos/Ha (65% hembras)

(10 cartuchos/ha)



Larvas

Pupas

***Tetrastichus howardi***

12,000 adultos/Ha

30 pupas *Galleria*/Ha

(3 cartuchos/ha)



Nematodo entomopatógeno

***Heterorhaditis bacteriophage***

50 millones/Ha



*Elasmopalpus, Spodoptera y otros*



***Diatraea spp***



***Telchin licus (Castnia licus)***



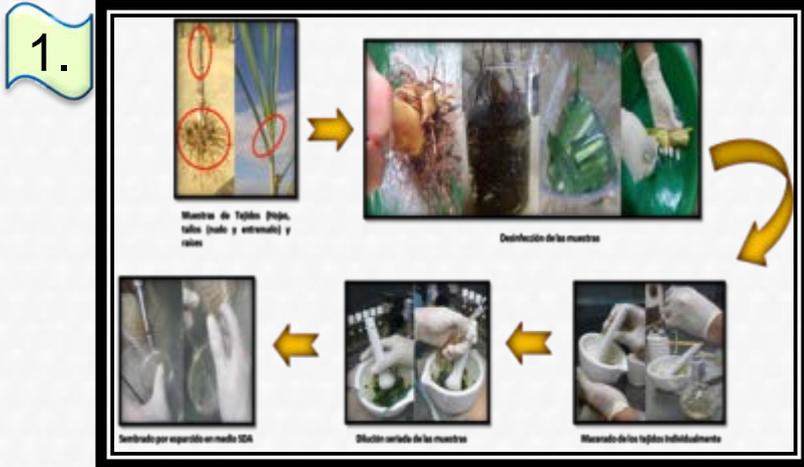
***Aeneolamia (Salivazo)***



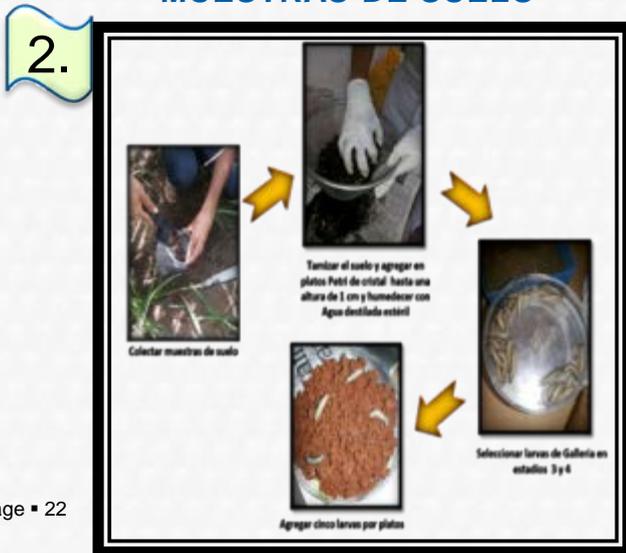
# Laboratorio de Producción de Hongos - LPH

# METODOLOGÍA DE AISLAMIENTO

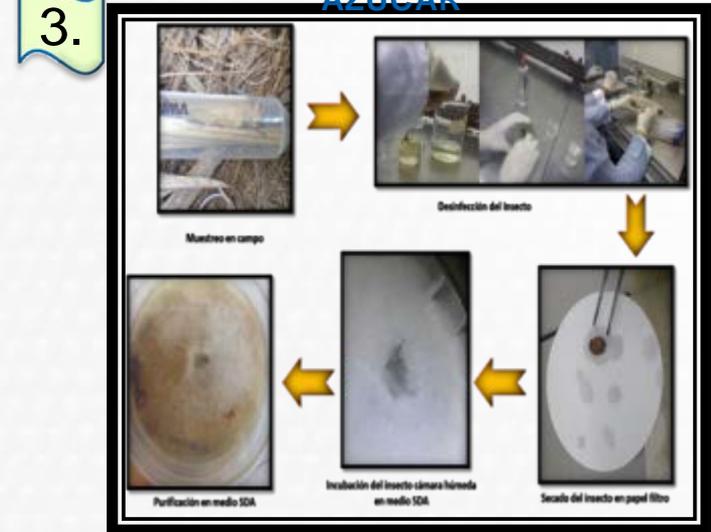
## TEJIDOS DE CAÑA DE AZÚCAR



## MUESTRAS DE SUELO



## INSECTOS DE CAMPOS DE CAÑA DE AZÚCAR



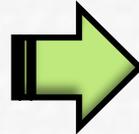
## COLECTA EN BOSQUES SECUNDARIOS



# METODOLOGÍA DE PRODUCCIÓN *Trichoderma sp*



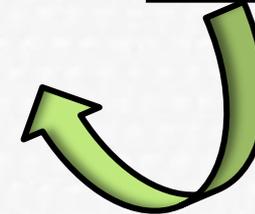
TUBOS PRESERVADOS



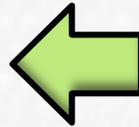
PLATOS PDA



TUBOS INCLINADOS PDA



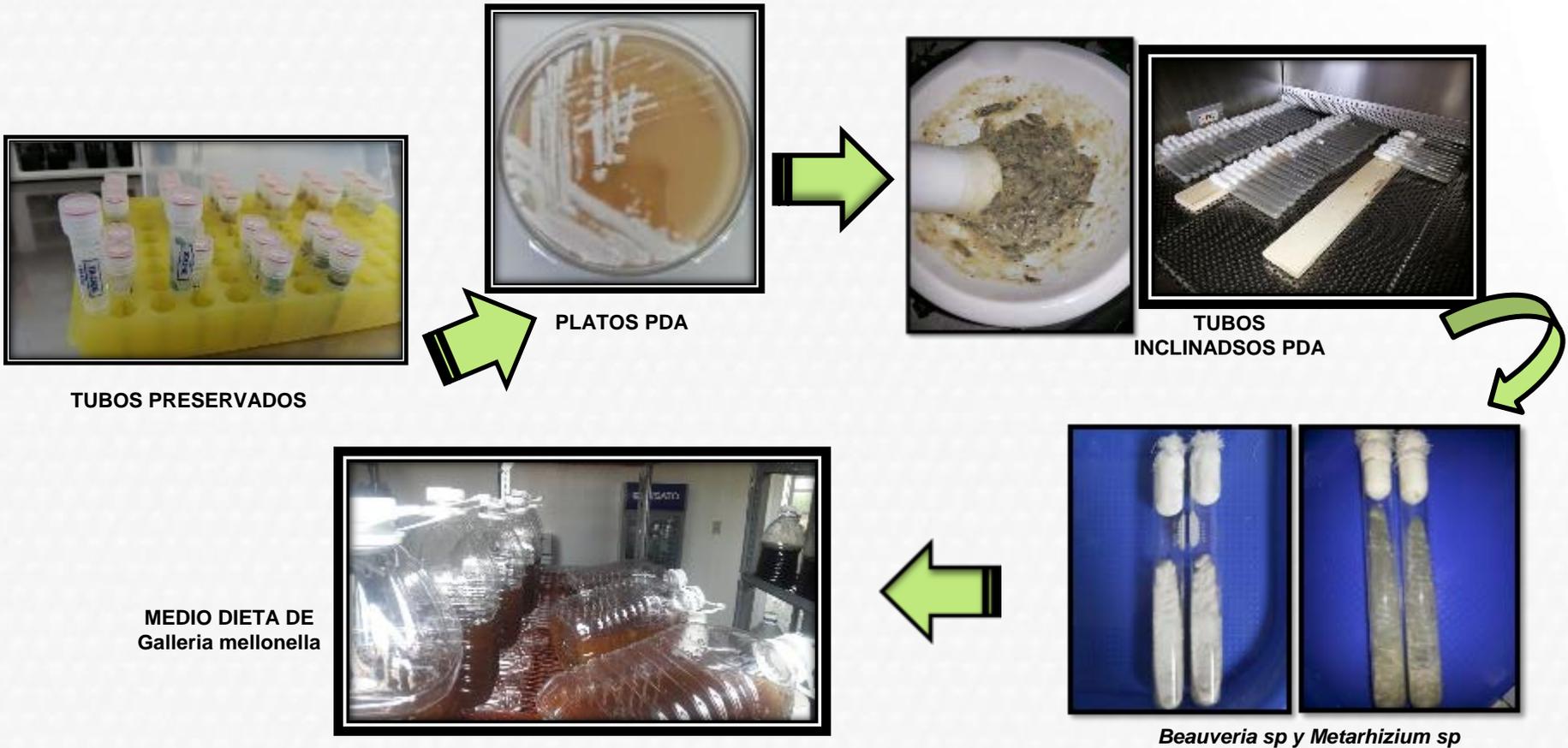
MEDIO SALES



MEDIO SALES- PROCTO FINAL

# METODOLOGÍA DE PRODUCCIÓN

## *Beauveria sp y Metarhizium sp*

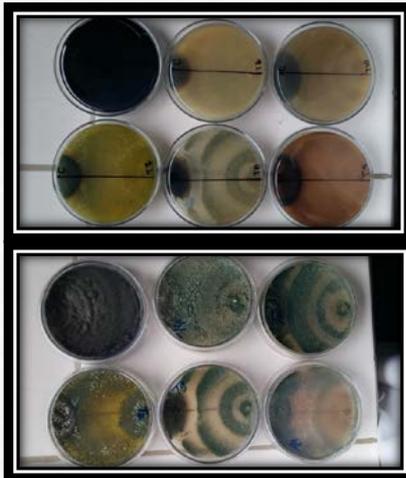


# Evaluación de Cepas de *Trichoderma* sp

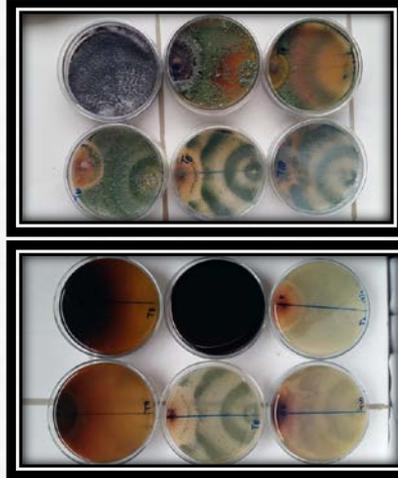


## Pruebas Antagonismo

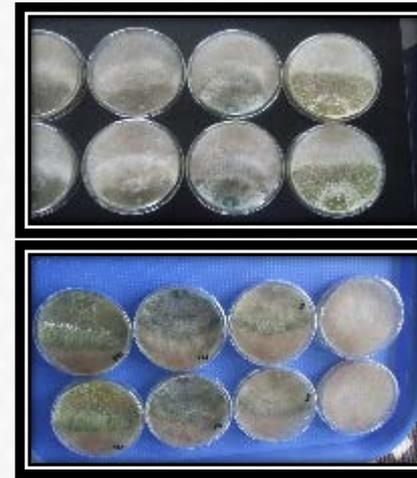
*Trichoderma* sp vs *Curvularia* sp



*Trichoderma* sp vs *Fusarium* sp



*Trichoderma* sp vs *Rhizopus* sp



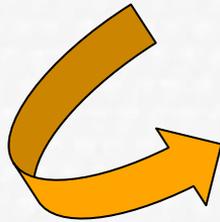
Los porcentajes de inhibición del crecimiento radial de *Fusarium* varían en un rango de 49 – 68 % mientras que los de *Curvularia* sp. entre 25 – 70%. Esto refleja que los aislados de *Trichoderma*, difieren en su poder antagónico hacia los patógenos selectos. El aislado de *Trichoderma* que tiene el mejor efecto antagónico contra *Fusarium* sp. mostró un porcentaje de 68% de inhibición; sin embargo, sólo ejerce un 50% de inhibición contra *Curvularia* sp. Las *Trichoderma* que presentan el mejor antagonismo contra *Curvularia* sp. mostró un porcentaje de 70% de Inhibición; sin embargo, sólo ejercen un 49% y 61% de inhibición contra *Fusarium* sp. En el caso antagónico contra *Rhizopus* sp las cepas mostraron un porcentaje de inhibición desde 80 a 93% considerándose según el rango de evaluación desde muy Alto a

Alto.

# Prueba de Virulencia con *Beauveria sp*

## Pruebas Virulencia

Larvas  
Micosadas



Los resultados obtenidos en el ensayo de virulencia utilizando larvas de *Galleria mellonella* inoculadas con 12 cepas de *Beauveria sp* mostraron resultados no muy relevantes debido a que se utilizaron larvas muy adultas.

Se logró observar que algunas cepas como **BV-CA11** y **BV-CA06** presentaron larvas micosadas por el hongo el cual fue identificado como perteneciente al género *Beauveria sp*.

# PRODUCCIÓN MASIVA

## MEDIO LÍQUIDO



Medio Dieta  
*Galleria mellonella*



Medio a Base de Sales

## MEDIO SÓLIDO



*Trichoderma sp*

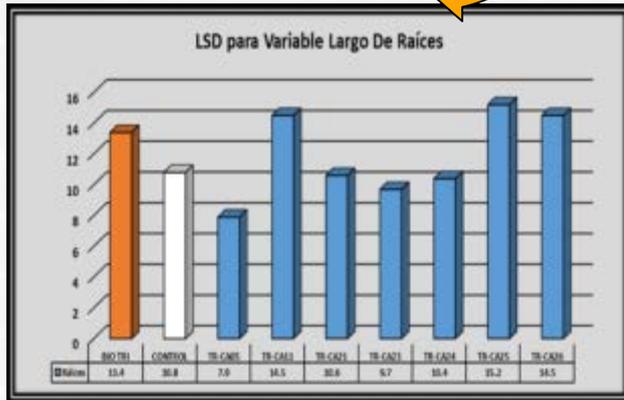


*Beauveria sp*

- Para la producción en medio líquido se utiliza como sustrato dieta usada de ***Galleria mellonella*** como también medio a Base de Sales. Para la producción en sólido se utiliza como sustrato de crecimiento arroz pre-cocido.

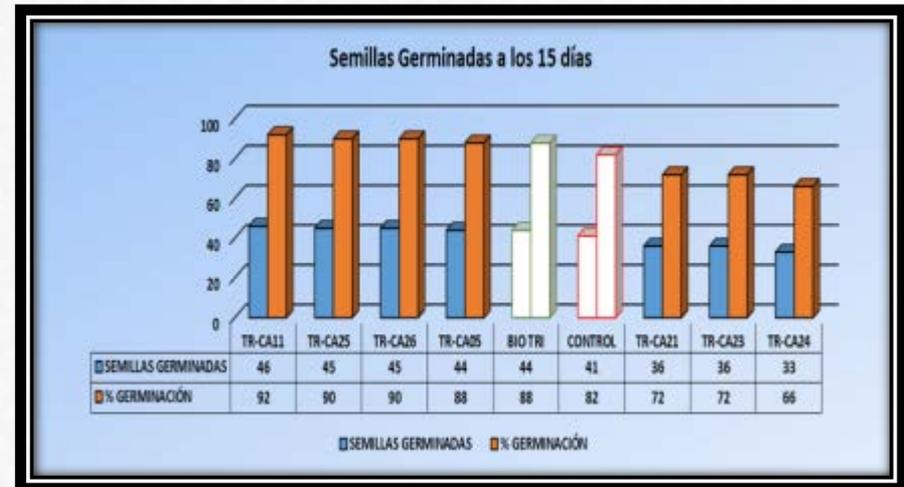
# PRUEBAS REALIZADAS

## PRUEBAS CON YEMAS DE CAÑA DE AZÚCAR



- Los tratamientos con mejores resultados fueron **TR-CA11**, **TR-CA25** y **TR-CA26** los cuales mostraron valores superiores al tratamiento **BIO TRI** y **CONTROL**.

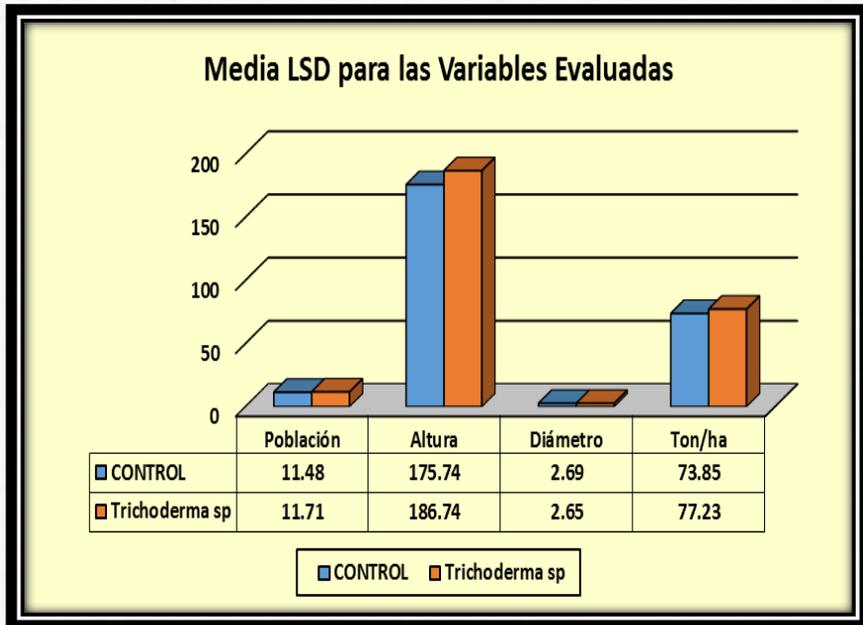
## PRUEBAS CON SEMILLAS DE ARROZ



Ensayo con semillas de arroz de la variedad IFL-137-11 (germinación de las semillas a los 15 días), donde los tratamientos **TR-CA11**, **TR-CA25**, **TR-CA26** y **TR-CA05** resultaron con valores mayores al tratamiento **CONTROL**.

# RESULTADOS OBTENIDOS

## CAMPOS COMERCIALES DE CAÑA DE AZÚCAR



Variables evaluadas fueron población, Altura, Diámetro y Ton/ha. Este campo fue inoculado con *Trichoderma sp.* Según los resultados, la cepa de *Trichoderma sp* resultó con porcentajes sobre el Tratamiento CONTROL en las variables Población (2.01%), Altura (6.25%), Ton/ha (4.57%), sin embargo para la variable Diámetro el tratamiento CONTROL fue superior al tratamiento inoculado.

## CAMPOS COMERCIALES DE ARROZ

### Fecha de Evaluaciones de Campos de ARROZ 2016

Campo	AREA	Tipo de Ensayo	Hectáreas Inoculadas	Hectáreas Testigo	Hectáreas Totales	Fecha de Siembra	Fecha de Inoculación I	Fecha de Inoculación II	Fecha de Cosecha	Rendimiento Ensayo QQ/Ha	Rendimiento Testigo QQ/Ha	Diferencia QQ/Ha
973	GANACO	Bacterias Endofitas BE + Tricho + CT	12.81	11.51	35.00		No se hizo	7-Sep-16		143.75	131.69	12.06
986	GANACO	BE + CT	24.87	21.89	46.76	21-Jul-16	9-Jul-16			121.51	107.86	13.65
550	SIERRA	BE + Tricho + CT	4.70	4.20	8.90	10-Aug-16	8-Aug-16	21-Sep-16		98.24	90.65	7.59

Los resultados de los campos 973, 986 y 550 pertenecientes a las fincas de GANACO muestran diferencias de rendimiento de 12.06, 13.65 y 7.59 QQ/Ha superiores al tratamiento control (sin inoculación). Esto representa un 9.1, 12.6 y 8.3 % de incremento con respecto al control.

# Equipo de Trabajo Biotecnología CALESA





# GRACIAS

