

# EVALUACIÓN DE AGENTES MICROBIANOS EN CAÑA DE AZÚCAR MICROPROPAGADA

## EVALUATION OF MICROBIAL AGENTS IN MICROPROPAGATED SUGAR CANE

José Luis Larriba Teodoro<sup>1</sup>, Joel Velasco Velasco<sup>1</sup>, Juan Valente Hidalgo<sup>1</sup>, Francisco Hernández  
Rosas<sup>1\*</sup>

Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, Córdoba México<sup>1</sup>

frosas@colpos.mx

**Resumen:** La caña de azúcar es uno de los cultivos más antiguos conocidos por el hombre, hoy en día ocupa cerca de 25 millones de hectáreas de tierra cultivadas en el mundo. Los métodos biotecnológicos en plantas mejoran el esquema de selección y producción, la micropropagación permite una mayor tasa de multiplicación de plantas que se propagan por métodos asexuales. La aclimatación es una etapa importante en el sistema de micropropagación de caña de azúcar. El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de adaptación de *Trichoderma harzianum* (ThN) y *Bacillus subtilis* (BsN) nativos vs *Trichoderma* (ThC) y *B. subtilis* (BsC) comerciales en plantas provenientes de cultivo *in vitro*. Los tratamientos que se evaluaron fueron ThN-C, BsN-C y ThN + BsN. El tratamiento con mayor estabilidad fue ThN + BsN, para el caso de Bs no hubo diferencia significativa entre nativo/comercial así como la combinación de los mismos, con una temperatura promedio de 28.4 °C.

**Palabras clave:** *Bacillus subtilis*, biorregulación y *Trichoderma harzianum*.

**Abstract:** Sugarcane is one of the oldest crops known to man today occupies about 25 million hectares of cultivated land in the world. Biotechnological methods in plants improve the selection and production scheme, micropropagation allows a higher rate of multiplication of plants that spread by asexual methods. Acclimatization is an important system sugarcane micropropagation stage. The aim of this study was to evaluate the adaptability of *Trichoderma harzianum* (THN) and *Bacillus subtilis* (BSN) vs native *Trichoderma* (ThC) and *B. subtilis* (BSC) from *in vitro* culture. The treatments evaluated were THN-C, BSN-C and THN + BSN. Treatment with greater stability was THN + BSN, in the case of Bs was no significant difference between native between commercial and the combination by itself, with an average temperature of 28.4 °C.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, biogulation and *Trichoderma harzianum*.

## Introducción

La caña de azúcar es uno de los cultivos más antiguos conocidos por el hombre, hoy en día ocupa cerca de 25 millones de hectáreas de tierra cultivadas en el mundo, la producción estimada es de 1,773 millones de toneladas de caña en el año 2012 (FAO 2013). Se cultiva comercialmente en 60 países de los cinco continentes. Las principales naciones que cultivan caña son Brasil, Cuba, Fiji, India, las islas de las Indias Occidentales y Estados Unidos. En años atrás Cuba era uno de los países líderes en la producción mundial de caña de azúcar (Naik 2001). En el 2011, Brasil tuvo una producción de 556 millones de hectáreas en tierras de cultivo ocupando el primer lugar en producción (FAO 2012). La industria de la caña de azúcar se ha desarrollado rápidamente, y representa el cultivo más importante en la producción de endulzante en el mundo.

Los métodos biotecnológicos en plantas mejoran el esquema de selección, para obtener un buen número de plantas idénticas a la planta madre libre de virus y enfermedades, usando la micropropagación masiva de meristemos, y para la obtención de nuevas variedades por medio de la variación somaclonal (Naik 2001). La micropropagación permite una mayor tasa de multiplicación de plantas que se propagan por métodos asexuales. Existen desventajas considerables que presentan las *in vitro* plántulas al momento de adaptación al medio natural después de su incubación en la cámara de crecimiento, esto es debido a su poca capacidad para resistir el estrés. Estas limitaciones se presentan debido a una cutícula poco desarrollada, estomas no funcionales, células heterotróficas, y un sistema radicular débil (Calla Zalles, 2002).

La aclimatación es una etapa muy importante en el sistema de micropropagación porque de esta depende la eficiencia del proceso y la calidad final de las plantas producidas *in vitro*, permitiendo que la planta llegue a un crecimiento autotrófico.

El cultivo de caña de azúcar para su desarrollo requiere de un paquete tecnológico establecido y que de este se obtengan los mejores rendimientos. Una de las prácticas comunes es el uso de enraizadores, fertilizantes foliares e insecticidas para la obtención de plántulas a partir de cultivo de tejidos y su siembra en campo (Harman *et al.*, 2004). Sin embargo, el costo ecológico ambiental es cada vez un aspecto que se cuestiona a cada día. Por lo que el uso de agentes de control biológico e inoculantes cobra cada día mayor auge por las ventajas ambientales y ecológicas que promueve, el estrés propio de la plántula al trasplantarla es un aspecto que distinguen el uso alternativo con biológicos como es el caso del hongo *Trichoderma harzianum* y la bacteria *Bacillus subtilis*. El objetivo de esta investigación fue evaluar los agentes de control biológico antes mencionados en plántulas provenientes de cultivo *in vitro*.

## **Materiales y Métodos**

Se establecieron 180 plantas de caña de azúcar variedad MEX 62-290 de dos meses de edad en un invernadero de 105 m<sup>2</sup> ubicado dentro de las instalaciones del Colegio de Postgraduados Campus Córdoba. Las plántulas contaron con temperatura y humedad controlada. Una vez obtenido los microorganismos nativos, proporcionados por el laboratorio de Biotecnología Microbiana Aplicada (BIOMA) del mismo campus, y obtenido los microorganismos comerciales *Bacillus subtilis* (Bs) y *Trichoderma harzianum* (Th) de nombre comercial SEDENADE y T-22, respectivamente. Se realizó la inoculación transcurrida una semana después del trasplante en macetas con capacidad de 6 kg, aplicando por plántula 50 ml de la solución a una concentración de  $2.16 \times 10^9$  UFC/ml. Transcurridas dos semanas después de la inoculación se procedió a realizar el primer muestreo, obteniendo con un sacabocado de 1 cm de diámetro, un promedio de 10 g de suelo por tratamiento. Los muestreos estuvieron calendarizados por un lapso de 15 días.

La siembra se realizó en medio AN para el caso de Bs y PDA para Th, se sembró la dilución -3 y -5 para ambos casos, con tres repeticiones para cada dilución. El análisis de resultados se realizó con un diseño experimental de bloques completos al azar y la prueba Tukey ( $P \leq 0.05$ ) utilizando el software SAS® institution.

## **Resultados**

Se observó una clara tendencia a la disminución de los microorganismos en el sustrato y que podría deberse a la competencia con microorganismos oportunistas o saprofitos, como bacterias del grupo de las coliformes que han encontrado las condiciones idóneas para establecerse. La presencia de ThN es elevada con una media de  $1.022 \times 10^{13}$  esporas/g, de igual manera para el caso de Th+BsN con media de  $5.59 \times 10^{12}$  esporas/g siendo estadísticamente iguales, puesto que se ha adaptado al cultivo y se ha reproducido, no así para el caso de ThC y T que expresaron nulo crecimiento en caja. En el caso de Bs tiende a ser más estable con un comportamiento similar con respecto al crecimiento, siendo estadísticamente iguales presentando medias para BsN ( $1.02 \times 10^6$  UFC/ml), BsC ( $6.97 \times 10^5$  UFC/ml) y BsN+ThN ( $9.01 \times 10^5$  UFC/ml) donde dichas concentraciones se mantuvieron y fueron aumentando con respecto al tiempo, esto para el caso del primer muestreo.

**Cuadro 1.** Esporas/g de *Trichoderma harzianum* nativo, comercial y la combinación de ambos.

Tratamiento	Esporas/g	Tiempo	Esporas/g
	Suelo		Suelo
ThN+BsN	5.594E+12 <b>A</b>	TIE 1	7.623E+12 <b>A</b>
ThN	1.022E+13 <b>AB</b>	TIE 4	4.128E+12 <b>A</b>
ThC	0.00E+00 <b>B</b>	TIE 3	2.525E+12 <b>A</b>
T	0.00E+00 <b>B</b>	TIE 2	1.533E+12 <b>A</b>

**Cuadro 2.** UFC/ml de *Bacillus subtilis* nativo, comercial y la combinación de ambos.

Tratamiento	UFC/ml	Tiempo	UFC/ml
	Suelo		Suelo
BsN+ThN	9.01E+05 <b>A</b>	TIE 1	1.70E+06 <b>A</b>
BsN	1.02E+06 <b>A</b>	TIE 3	9.21E+05 <b>B</b>
BsC	6.97E+05 <b>A</b>	TIE 2	3.62E+05 <b>BC</b>
T	5.46E+05 <b>A</b>	TIE 4	1.88E+05 <b>C</b>

## Discusión

Se observaron diferencias significativas entre el tratamiento ThN, ThN+BsN con respecto al resto de los tratamientos, teniendo un crecimiento estable conforme al paso del tiempo. Estudios de micoparasitismo demuestran que Th produce una rica mezcla de enzimas antifúngicas, incluyendo quitinasas y  $\beta$ -1,3 Glucanasas, estas son sinérgicos entre sí y con otras enzimas antifúngicas (2). Lo cual pudiera explicar a la interacción que tiene con Bs y que estos por ser nativos soportan las condiciones del medio. Para el caso de Bs tanto el agente nativo como el comercial y su combinación presentaron crecimiento estadísticamente igual, no así mismo conforme al paso del tiempo, ya que el tiempo uno, presento mayor número de UFC/ml con respecto a los tiempos dos, tres y cuatro.

## Conclusiones

Una sola aplicación de los tratamientos, no basta para que se establezcan los microorganismos debido a que presentan un comportamiento errático. Sin embargo, aun cuando la presencia de estos resulta poco predecible, es evidente que los aislamientos nativos adaptados a condiciones de estrés abiótico, presentan una ventaja para su establecimiento y reproducción con respecto a los aislamientos comerciales, no así para el caso de Bs, que tanto nativo como comercial y la combinación de los mismos, presentan una adaptación similar, ya que estadísticamente presentaron las adaptación similar al medio.

## Literatura citada

1. Muños Rojas, J. (2004). La micropropagación de caña de azúcar y sus implicaciones. España, EEZ-CSIC. 20 p.
2. Harman, G.E., Petzoldt, R., Comis, A., Chen, J. (2004). Interactions Between *Trichoderma harzianum* Strain T22 and Maize Inbred Line Mo17 and Effects of These Interactions on Diseases Caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* 94: 147–153.
3. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). (2013). (en línea). Consultado 28 de noviembre de 2013. Disponible en: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/S>.
4. Naik, G.R. (2001). SUGARCANE BIOTECHNOLOGY: Tissue culture studies in sugarcane. USA. Department of Biotechnology Gulbarga University, Gulbarga Karnataka, India 32-53 p.
5. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). (2012). Agronoticias América Latina y el Caribe. Reducen el pronóstico en la producción de caña de azúcar en Brasil (en línea). Consultado 22 de mayo. 2012. Disponible en [http://www.fao.org/agronoticias/agro-noticias/detalle/es/?dyna\\_fef%5Buid%5D=149130](http://www.fao.org/agronoticias/agro-noticias/detalle/es/?dyna_fef%5Buid%5D=149130).
6. Calla Zalles, B. (2002). Efectos del Mycoral® durante la aclimatación y endurecimiento de plátano (*Musa spp*) Cuernos y FHIA- 20 producidos a partir de ápices meristemáticos. Tesis Ing. Agr., Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. 32 p.