

INFORME DE SEGUIMIENTO

PROYECTO DE COLABORACIÓN:

“Desarrollo de metodologías para el manejo fitosanitario y la biofertilización de la caña de azúcar”

INFORME FINAL (2019)

**Organismo Responsable: Grupo Empresarial AZCUBA.
(República de Cuba)**

Entidad Ejecutora: Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar

Contraparte Técnica:

Contraparte Extranjera:

- Instituto de Tecnología Agroindustrial del Noroeste Argentino (ITANOA), dependencia de CONICET-EEAOC (Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres), Tucumán, Argentina.

- Empresa Brasileña de Investigación Agropecuaria (EMBRAPA)-Agrobiología, Seropedica, Río de Janeiro, Brasil

INDICE

I – CARACTERIZACIÓN DEL PROYECTO..... 1

II – INFORME TECNICO.....2

III – INFORME ADMINISTRATIVO CONTABLE.....5

I – CARACTERIZACIÓN DEL PROYECTO.

1. Líneas de Acción.

Desarrollo humano sostenible con el apoyo a procesos dinamizadores e innovadores de la economía potenciando el desarrollo de sectores clave y el estímulo al comercio exterior
Los cambios fundamentales que ejercerán los resultados de este proyecto están dados en:

1. Establecimiento de vitroplantas de caña de azúcar para semilla con mayor vigor y adaptabilidad.
2. Disminución del uso de fertilizantes nitrogenados con la consiguiente conservación de los suelos.
3. Disminución del empleo de plaguicidas.

2. Entidad local cubana responsable.

Nombre y Dirección: Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), Carretera CUJAE Km. 1½, Boyeros, La Habana, Cuba, Teléfonos: (537) 260 2571, (537) 262 4436-37, E-mail: inica@inica.azcuba.cu, www.inica.azcuba.cu

Nombre del responsable y sus funciones: Dra. María de la Luz La O
Hechavarría,

3. Objetivo General.

Desarrollar una metodología para la estimación del aporte de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en el metabolismo nitrogenado de la caña de azúcar y a su manejo fitosanitario.

4. Objetivo Específico

Establecer una metodología de inoculación de las cepas marcadas en el flujo productivo en los sistemas de inmersión temporal de la Biofábrica de caña de azúcar.

Estimar el aporte a la fijación Biológica del nitrógeno de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en áreas experimentales y a la *resistencia a enfermedades de las plantas*

5. Presupuesto inicial

23 000.00 USD, equivalentes a 23 000.00 CUC (según tasa de cambio 1.00 USD por 1.00 CUC de fecha 1ro de septiembre del 2012)

Desembolso: Fecha de desembolso del financiamiento

Moneda Nacional: ___45 000.00 CUP que serán aportados por el INICA

Temporalización.

Fecha de inicio de proyecto: 2018

Fecha de finalización de proyecto: 2019

II – INFORME TÉCNICO

Estado de avance del proyecto (parte cualitativa)

Principales acciones realizadas durante el año 2018

De acuerdo al cronograma de actividades previstas para este año, los principales resultados obtenidos se describen a continuación:

Resultado 1 Establecimiento de la metodología de inoculación de las cepas marcadas en el flujo productivo en los sistemas de inmersión temporal de la Biofábrica de caña de azúcar

Actividades:

1.1 Insertar del gen reportero GusA en la bacteria

Se realizó el marcaje de las cepas 166-INICA y Pal5 (patrón) con el gen reportero *gusA* por combinación triparental con *E. coli* como vector. Se utilizó la construcción *pFs7p-gusA* constituida por el plásmido *RK2* de amplio espectro, el cual contiene un promotor constitutivo fusionado al gen *gusA*, Tc^R , lo cual fue confirmado por el desarrollo de una coloración azul índigo al reaccionar la enzima β -glucuronidasa con el sustrato X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolyl glucuronido).

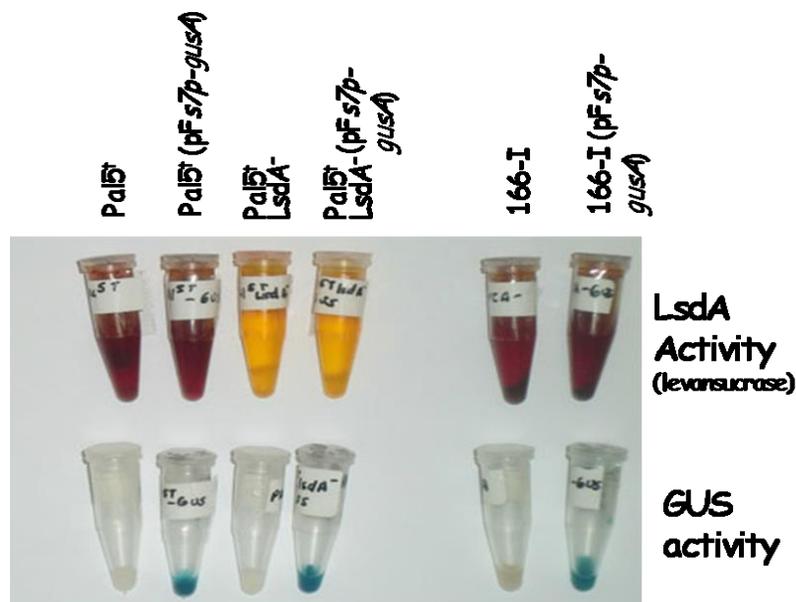


Fig. Marcaje de las cepas 166-INICA y Pal5 de *Gd* con gen reportero *gusA* (color azul), se muestra además la actividad levanosacarasa en la cepa patrón. Realizado en el laboratorio Sede, INICA

1.2 Obtener un método de inoculación efectivo en BIT.

Se utilizó la cepa 166-INICA de *Gluconacetobacter diazotrophicus* previamente marcada con el gen reportero *gus-A* con el objetivo de obtener un método de inoculación efectivo en flujo productivo para la obtención de vitroplantas de caña de azúcar, con valor agrgado por este concepto. La bacteria fue cultivada en medio Papa-P líquido durante 48 horas a 30 grados Celsius hasta concentración de 10^8 ufc.mL⁻¹. Como criterio de efectividad se tomó la colonización de hoja, tallo y raíz dada la condición sistémica del microorganismo (m.o). El cultivar de caña de azúcar utilizado fue C1051-73 inoculado en fase de enraizamiento inicial, intermedia (6 días) y final (48 horas a término) en biorreactores de inmersión temporal (BITs) con diferentes volúmenes del cultivo bacteriano (25µL, 50µL, 2mL, 4mL, 20mL y 100mL) y tres repeticiones.



Realizado en Biofábrica, Villa Clara-INICA



Las inoculaciones en BITs(fig.) realizadas al comienzo de la fase de enraizamiento con los diferentes volúmenes de inóculo probados fue desechada al producir clorosis en las vitroplantas (Fig.). El largo tiempo de exposición del microorganismo en el medio de enraizamiento hace que este compita con las vitroplantas por la fuente carbonada. Las inoculaciones realizadas a mitad de la fase de enraizamiento no arrojaron resultados efectivos con ninguno de los volúmenes de inóculo utilizados.



Realizado en Biofábrica, Villa Clara-INICA



Resultados positivos fueron obtenidos con las inoculaciones realizadas al final de la fase de enraizamiento (48 horas a término), con volumen de inóculo 5% (100 mL) en el medio de enraizamiento.

1.3 Determinar la presencia la bacteria en diferentes tejidos de la planta.

La presencia del m.o en las vitroplantas se determinó al final de la fase de adaptación (45 días). Se maceraron las muestras en N líquido y se extrajeron los ácidos nucleicos totales (ADN-ARN) empleando la técnica de CTAB (del inglés “Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide”), con el protocolo propuesto por Aljanabi *et al.* (1999), modificado en el laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC), Argentina. Los ácidos nucleicos se suspendieron en agua bidestilada estéril y su calidad se monitoreó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. La detección de la bacteria en las muestras se llevó a cabo por ampliación del gen 23S ARNr con cebadores específicos para la especie: 5'-GTTGGCTTAGAAGCAGCC-3' y 5'-TGCGGCAAAGCCGGAT-3', los cuales producen una banda amplificada de 491pb.

Tabla

Inóculo	Cepas	Al inicio			A los 6 días			A los trece días		
		H	T	R	H	T	R	H	T	R
25 µL	166-I	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pal5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50 µL	166-I	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pal5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 mL	166-I	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pal5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4 mL	166-I	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pal5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20 mL	166-I	-	-	-	-	-	+	-	+	+
	Pal5	-	-	-	-	-	-	-	-	+
100 mL	166-I	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	Pal5	-	-	-	-	-	+	+	+	+

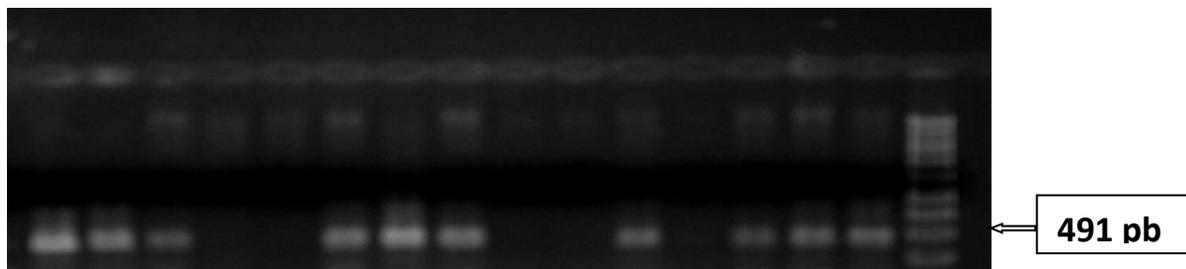


Figura. Bandas de amplificación del gen 23S ARNr con cebadores específicos en hoja, tallo y raíz en el cultivar C1051-73, volumen de inóculo 5% (100 mL) *G. diazotrophicus* cepa 166-I concentración 10^8 ufc.mL⁻¹ en fase en enraizamiento 48 horas a término. R (raíz), C (controles), T (tallo), H (hoja), MM (marcador molecular). Realizado en laboratorio Sede-INICA

Resultado 2 Estimación de la fijación Biológica del nitrógeno aportada por *Gluconacetobacter diazotrophicus* en áreas experimentales.

Actividades

2.1 Plantar un ensayo en condiciones de campo en áreas experimentales

Vitroplantas de caña de azúcar de los cultivares C90-469 y C1051-73 inoculadas con la celda 166-INICA de *Gluconacetobacter diazotrophicus* marcada con el gen reportero gus-A y sus respectivos controles con 45 días, procedentes del área de adaptación a campo de la Biofábrica de Villa Clara, fueron sembradas en Suelo Ferralítico Rojo de la Estación Experimental de Jovellanos, siguiendo el diseño que aparece a continuación. Debido a que el experimento tiene como objetivo la estimación de la Fijación Biológica del Nitrógeno debida al endófito inoculado, utilizando la metodología de abundancia natural del isótopo ^{15}N , se incluye además la siembra de 2 plantas de referencia, sorgo y maíz.

21-E	22-A	23-B	24-C	25-D
16-D	17-E	18-A	19-B	20-C
11-C	12-D	13-E	14-A	15-B
6-B	7-C	8-D	9-E	10-A
1-A	2-B	3-C	4-D	5-E

LEYENDA

- A- Tratamiento 1 C90-469 inoc.
- B- Tratamiento 2 C90-469 control
- C- Tratamiento 3 C1051-73 inoc.
- D- Tratamiento 4 C1051-73 control
- E- Tratamiento 5 sorgo y maíz (plantas referencia)



Estación Experimental de Jovellanos, Matanzas, Cuba



Muestras gráficas del montaje del experimento, Jovellanos, Matanzas, Cuba

Se realizaron análisis del contenido de nitrógeno total e hidrolizable del suelo de cada parcela, cuyos resultados se muestran en la tabla

Parcelas	Tratamiento	% Nt	nh (ppm)
1	A	0.130	74.0
10	A	0.126	69.2
14	A	0.123	48.6
18	A	0.133	54.4
22	A	0.140	62.6
2	B	0.130	56.1
6	B	0.067	80.4
15	B	0.133	59.4
19	B	0.144	55.2
23	B	0.133	72.0
3	C	0.123	77.8
7	C	0.139	66.6
11	C	0.130	56.0
20	C	0.154	80.8
24	C	0.133	70.9
4	D	0.115	81.5
8	D	0.147	81.7
12	D	0.126	77.6
16	D	0.137	52.4
25	D	0.123	64.6
5	E	0.137	49.2
9	E	0.144	63.6
13	E	0.144	60.8
17	E	0.123	61.0
21	E	0.144	74.8

Se realizó además el análisis de nitrógeno foliar de la hoja +1 de caña de azúcar a los 6 meses, según Kuifer. Las muestras fueron procesadas en la Estación Experimental de Santiago de Cuba siguiendo el método Kjeldahl, establecido en el Manual de Procedimientos para laboratorios de Análisis químico del Departamento de Suelos y Agroquímica del Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar, del año 2000, cuyos resultados se muestran a continuación.

Parcela	N Foliar % N
1	1.63
2	1.52
6	1.71
7	1.73
8	1.71
10	1.7
11	1.61
14	1.87
15	1.68
16	1.89
18	1.16
19	1.36
20	1.78
22	1.67
23	1.51
24	1.42
25	1.59

Se realizó una Misión de intercambio llevada a cabo entre 14-28 de octubre de 2018, en Argentina al Departamento de Anatomía Vegetal de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Tucumán e Instituto Miguel Lillo (UNT)

*2.2 Tomar muestras foliares para la estimación de la fijación biológica del nitrógeno de *G. diazotrophicus* mediante la técnica de abundancia natural ^{15}N*

Se realizaron muestreos de la hoja +3, de las cuales se tomó el tercio medio y llevadas a peso seco en estufa a 85 grados Celsius. Las muestras fueron después pulverizadas en ultraturrax hasta consistencia de talco. La planta de referencia utilizada (sorgo), fue procesada de igual forma tomándose en este caso la planta completa. Las muestras fueron conservadas, para ser analizadas para su contenido de ^{15}N mediante espectrometría de masa, en EMBRAPA Agrobiología, en Brasil.

Acciones realizadas en el 2019.

Se ejecutó una misión durante los días del 15-22 de mayo para el análisis de las muestras en el laboratorio de ciclaje de nutrientes de EMBRAPA Agrobiología, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

En la tabla se observan los resultados del procesamiento de las muestras

TRATAMIENTO	variedad	número muestra	ton- ha	N- FOLIAR	15N
control	C1051-73	4	51.14	1.76	7.455
control	C1051-73	8	45.45	1.71	7.889
control	C1051-73	16	46.46	1.890	7.390
control	C1051-73	25	46.88	1.590	7.571
control	C90-469	2	60.61	1.52	6.912
control	C90-469	6	50.76	1.71	8.188
control	C90-469	15	57.10	1.68	7.612
control	C90-469	19	47.73	1.36	7.753
control	C90-469	23	42.05	1.510	7.470
inoculada	C1051-73	7	80.49	1.73	8.107
inoculada	C1051-73	11	88.54	1.61	7.923
inoculada	C1051-73	20	61.79	1.78	7.744
inoculada	C1051-73	24	88.54	1.42	7.487
inoculada	C90-469	1	89.96	1.63	7.075
inoculada	C90-469	10	81.77	1.7	7.421
inoculada	C90-469	14	82.86	1.870	7.230
inoculada	C90-469	18	86.93	1.16	7.384
inoculada	C90-469	22	74.81	1.67	7.406
SORGO		5			6.554
SORGO		13			6.344
SORGO		21			7.109

Como puede observarse en la última columna no se encontraron diferencias en cuanto a la abundancia natural de nitrógeno 15 en las muestras cuando se compararon con la planta no fijadora sorgo, lo cual indica que los incrementos en el rendimiento no se deben a la fijación biológica del nitrógeno, sino a otros factores como efecto hormonal producido por la inoculación de la bacteria, por lo que deberán realizarse otras investigaciones desde el punto de vista molecular para demostrar esta hipótesis.

3 Estimada la contribución de G. diazotrophicus a la resistencia de las plantas

Actividades

3.1 Plantar un ensayo de inoculación cruzada de cepas del patógeno X.albilineans y cepas G. diazotrophicus en áreas experimentales

Se seleccionaron cultivares con reacción de resistencia contrastante a la enfermedad escaldadura foliar: C1051-73 (susceptible) y C90-469 (resistente), los que se encontraban en bandejas en fase de adaptación a término (45 días) en la biofábrica de caña de azúcar del INICA localizada en Villa Clara. Las plantas se llevaron a vivero en la Estación Experimental de Jovellanos. La distancia entre cada una fue de 50cm a modo de evitar sobrepoblación y competencia.

Se utilizaron cinco surcos de cada variedad con cuatro réplicas, cada uno con diez plantas para cada tratamiento. A los dos primeros se les aplicó agua destilada 1) control

sano, 2) control de infección Xa, 3) control Gd y 4) Gd+Xa. La cepa 166-I de Gd marcada con el gen reportero GusA se inoculó a una concentración de 2×10^8 ufc.mL⁻¹, la cual se incubó por 24 h en medio líquido Papa. El método que se utilizó fue punción de la zona de crecimiento apical con aguja de jeringuilla de 1ml de capacidad. Posteriormente, se asperjó el área foliar con dicha suspensión hasta punto de goteo. Quince días después se realizó la inoculación con la bacteria patógena *X. albilineans*, por el método de decapitación, excepto al control sano. Se empleó la cepa 74-Xa a una concentración de 3×10^8 ufc.mL⁻¹, previamente incubada durante 72 h en medio Wilbrink líquido con agitación constante. Las plantas se mantuvieron con riego días alternos hasta los cuatro meses.

3.2 Tomar muestras foliares para análisis histopatológicos

Detección histoquímica de *G. diazotrophicus*: Se realizó 30 días posterior a la inoculación con Xa, para detectar el gen reportero Gus A con el sustrato X Gluc. Se realizaron cortes de tejido semifinos al estereoscopio y fijaron 30min en hielo con el fijador (Formadehído 4%, preparado al momento de utilizarse), se movieron ocasionalmente. Luego se lavaron 30 min con buffer fosfato de sodio 0,1M al 2X frío.

Se infiltró al vacío la solución con el sustrato (1mg de 3bromo-4cloro-3indol-βD glucoronido (XGlu) en 0,1 ML de metanol y 1ml de buffer fosfato 2X y 10 μl de Tritón X-100 (peso-volumen) por dos minutos. Al momento de aplicar y sacar del vacío se realizó lentamente para evitar rupturas del tejido. Lavado con agua destilada. Incubación con etanol al 70% hasta que se decoloró (varios cambios 24-48h), luego se transfirieron a agua destilada y se observaron al microscopio con objetivo 40X en glicerol 100%.

Caracterización fitopatológica: Se realizaron muestreos mensuales y se registró el número de plantas con síntomas por tratamiento y réplica de cada cultivar. A los cuatro meses posteriores a la inoculación, se determinó el porcentaje de infección (PI) como: $PI = \# \text{ de plantas infectadas} / \# \text{ total de plantas} * 100$ (Jorge *et al.*, 2011). La respuesta de los cultivares a los tratamientos se calculó de acuerdo a la escala propuesta por Rott *et al.* (1994). Además se midieron la altura, diámetro y peso fresco de la parte aérea de 20 plantas de cada tratamiento. Para la comparación de las medias se aplicó la alternativa no paramétrica del análisis de varianza, la prueba Kruskal-Wallis y entre parejas de grupos se utilizó la prueba de Mann-Whitney.

Se tomaron muestras de los tercios basales de cinco hojas+3 de cada tratamiento y se consideraron como muestra única. Se conservaron a -20°C para la extracción de los ácidos nucleicos totales y las secciones de los tercios medios de 1,0 cm² medios se fijaron en FAA (5ml de Formaldehído, 5ml de ácido acético, 90ml de etanol al 70%) para los análisis histológicos.

Caracterización molecular: Se realizó la extracción de ácidos nucleicos totales según el protocolo descrito por Aljanabi *et al.* (1999), los que se suspendieron en agua bidestilada estéril y su calidad se monitoreó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) se emplearon cebadores específicos para cada bacteria.

Para la detección de *G. diazotrophicus* se utilizaron cebadores que amplifican el gen 23S ADN-ribosomal: 1440/F 5'-GTTGGCTTAGAAGCAGCC-3' y AD/R 5'-TGCGGCAAAGCCGGAT-3', que generan un producto de 411pb. Se realizó en un termociclador PTC100 (MJ Research, USA), con el siguiente programa de reacción: un

ciclo a 94°C por 3 min; 40 ciclos a 94°C por 30 s, 56°C por 30 s y 72°C por 1min y un ciclo final a 72°C por 5 min (Kirchhof *et al.*, 1998).

Para la detección de *X. albilineans* se utilizaron los cebadores PGBL1: CTTTGGGTCTGTAGCTCAGG y PGBL2: GCCTCAAGGTCATATTCAGC que amplifican un producto de 288pb. La misma se llevó a cabo en un termociclador PTC100 (MJ Research, USA), con el siguiente programa de reacción: un ciclo a 95°C por 5 min; 40 ciclos a 94°C por 10 s, 57°C por 10 s y 72°C por 30s y un ciclo final a 72°C por 2 min.

Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, seguido de la tinción en GelRed™ 0,001% (Biotium, EE. UU.) y visualización bajo luz U.V.

Caracterización histológica: Se realizaron cortes transversales de la lámina de la hoja a mano alzada con el auxilio de cuchilla, según la técnica de Dizeo de Strittmater (D'Ambrogio de Argüeso, 1986). Los fragmentos con un grosor de 12 a 14 µm se clarificaron mediante lavados sucesivos en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% (v/v).

Se utilizó azul de cresilo (3 µg mL⁻¹) para determinar la presencia de celulosa en las paredes primarias y el citoplasma según Pérez y Tomasi (2002), así como la presencia de lignina con safranina-verde rápido (3 µg mL⁻¹). Se realizaron preparaciones semipermanentes en portaobjetos con agua-glicerina 1:1 (v/v) según Debes (2013) y se observaron en microscopio óptico (Leica DM 500, Alemania) y fotografiadas con cámara digital Sony DSC-W55 (Japón).

Resultados

Detección histoquímica de *G. diazotrophicus*

Se confirmó la efectividad del método de inoculación del endófito *G. diazotrophicus* mediante el revelado del gen reportero Gus A con la observación de color azul (Figura 1), debido a la reacción de la enzima β-glucoronidasa sobre el sustrato específico XGluc en el tejido vascular del cultivar C1051-73.

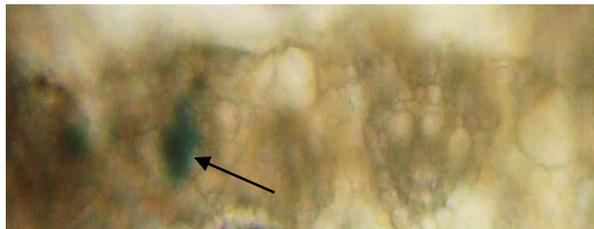


Figura 1. Detección histoquímica del gen reportero Gus A (en color azul), en corte transversal de hoja de la variedad C1051-73, 30 días posterior a la inoculación con *G. diazotrophicus*. La flecha indica su ubicación en el tejido vascular.

Caracterización fitopatológica

Se demostró la patogenicidad del aislamiento bacteriano de *X. albilineans*, así como la efectividad de la inoculación, por el desarrollo de síntomas típicos de escaldadura foliar de la caña de azúcar. Esto se evidenció en las plantas controles de infección Xa, en el cultivar susceptible C1051-73, a partir de los quince días posteriores a la inoculación. Luego la muerte al cabo del mes, por lo que este tratamiento no se tuvo en cuenta para el análisis estadístico, a los cuatro meses postinoculación. Momento donde se comprobó que las diferencias se encontraron entre variedades (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la inoculación de *G. diazotrophicus* y *X. albilineans* sobre las variables altura, diámetro del tallo y peso fresco de la parte aérea de las plantas en los cultivares de caña de azúcar C1051-73 y C90-469.

Factores de variación	Grados Libertad	Altura		Diámetro		Peso fresco	
		SC		SC		SC	
Repeticiones	5	98,71	ns	0,19500	ns	1699,97	ns
Variedad (Var)	1	704,17		0,73500	**	8694,43	**
Tratamiento (Tto)	1	13,50	ns	0,10667	ns	351,14	ns
Var*Tto	1	24,00	ns	0,01500	ns	786,61	ns
Error	20	555.67		0.56333		6730.12	

SC: Suma de cuadrados, **: significación estadística para $p \leq 0.05$, ns: no significativo.

Estos resultados indican que con la aplicación de *G. diazotrophicus* se logra protección de las plantas susceptibles, sin variar los parámetros morfológicos de las mismas por inducir el efecto de resistencia sistémica adquirida.

Caracterización molecular:

Se confirmó la ausencia de ambas bacterias en los controles sanos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. También, la presencia de *G. diazotrophicus*, en los tratamientos inoculados con este endófito (Figura 2A) que corroboraron los resultados de la detección histoquímica. En el caso de *X. albilineans* (Figura 2B), se amplificó un producto con la talla esperada (288pb) en los controles de infección del cultivar susceptible. En tanto que disminuyó su intensidad en los tratamientos que presentaban Gd, a partir de los quince días de inoculadas las plantas y en el cultivar resistente. Esto concuerda con los resultados de los chequeos fitopatológicos hasta la última evaluación realizada, a los cuatro meses postinoculación.

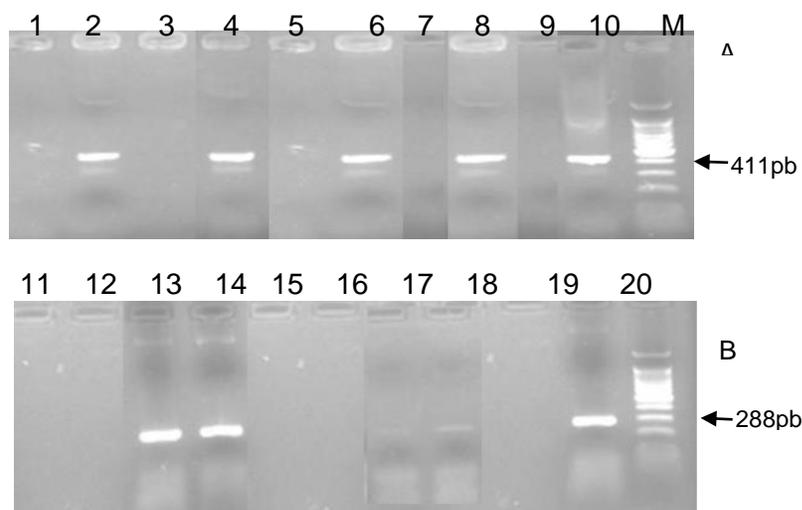


Figura 2. Fragmentos amplificados por PCR específicos a *G. diazotrophicus*, A y B: *X. albilineans*, en el cultivar susceptible a escaldadura foliar C1051-73 (S) y resistente, C90-469 (R). Con los tratamientos: 1. Control sano (S: 1 y R: 7), 2. Control Gd (S: 2 y R: 8), 3. Control de infección Xa (S: 3 y R: 9) y 4. Gd+Xa (S: 4-6 y R: 10-12, a los 15, 30 y 45 días postinoculación, respectivamente). Control negativo: mezcla de reacción sin ADN: 13, control positivo: 14, Gd (A) y Xa (B). M: 100bp DNA Ladder (Promega).

Caracterización histológica:

En los cortes transversales de la lámina de hojas de los controles del cultivar C1051-73 no se observan inclusiones citoplasmáticas en las células del parénquima, alrededor de los haces vasculares (Figura 3A, B). Sin embargo, a los 30 días posteriores a la inoculación del endófito *G. diazotrophicus* (tratamiento 2: control Gd) aparecen sustancias de aspecto refringente (Figura 3C, D, E), que aumentan su cantidad en las plantas con el tratamiento Gd+Xa (Figura 3F, G, H).

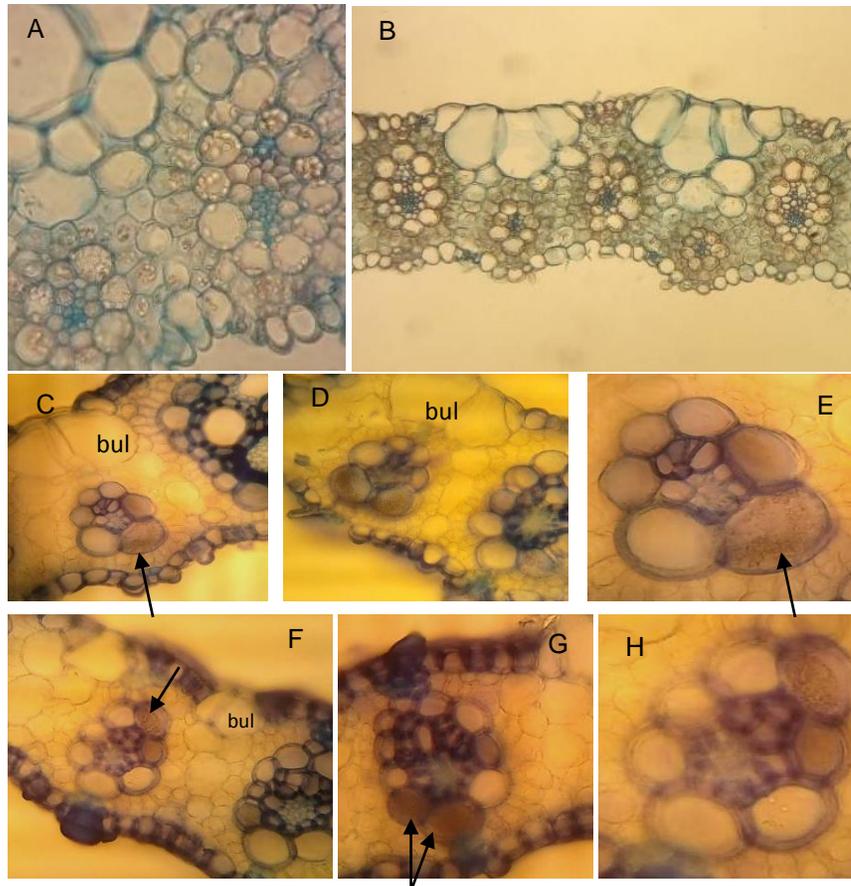


Figura 3. Anatomía foliar del cultivar C1051-73, a través de cortes transversales de la lámina de la hoja, 30 días posteriores a la inoculación. Se utilizaron los tratamientos: 1, control sano (A, B). 2, Control Gd (C, D, E) y 4, plantas inoculadas con Gd+Xa (F, G, H), Las plantas controles de infección Xa (tratamiento 3), no se analizaron porque estaban muertas en este tiempo. Las flechas indican inclusiones presentes en las células de la vaina de haces menores que se ubican a la altura de las células buliformes (bul).

La acumulación de estas sustancias en el interior de las células que rodean los haces vasculares coincide con la detección del gen reportero Gus A, a los 30 días posteriores a la inoculación. Además, la acción de Gd sobre Xa, puede haber ocasionado que Xa no haya podido establecerse, lo que concuerda con los resultados de los análisis fitopatológicos con ausencia de síntomas de la enfermedad en el cultivar susceptible y la disminución de la intensidad del fragmento de ADN específico amplificado por PCR.

Conclusiones

Se corroboró mediante estudios fitopatológicos, histoquímicos y moleculares la inducción diferencial de respuesta adquirida por las plantas hasta los cuatro meses posteriores a la inoculación del patógeno, lo cual aporta nuevas evidencias del papel de la bacteria endófito *G. diazotrophicus* como control biológico de *X. albilineans*.

Esta metodología se podrá implementar en los bancos de semilla para darle un valor agregado a las plantas con la consecuente disminución de pérdidas por la enfermedad escaldadura foliar que está presente en 86% de las plantaciones comerciales.

Referencias

- Aljanabi, S. M.; L. Forget and A. Dookun. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide-and polyphenol-free sugarcane DNA. *Plant Molecular Biology Reporter* 17: 1-8. 1999.
- Arencibia, A.D., Estevez, Y., Vinagre, F., Bernal, A., Pérez, J., Carmona, E., Hemerly, A.S. and Santana, I. (2006). Induced-resistance in sugarcane against pathogenic bacteria *Xanthomonas albilineans* Mediated by an Endophytic Interaction. *Sugar Tech* 8(4):272-280.
- Kloepper JW & Ryu C-M. 2006. Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance. *Microbial Root Endophytes* (Schulz BJE, Boyle CJC & Sieber TN, eds) pp. 33- 52. Springer-Verlag, Berlin.
- Piñón, D., Casas, M.A., Blanch, M., Fontaniella, B., Blanco, Y., Vicente, C., Solás, M.T. and Legaz, M.E. (2002). *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugar cane endosymbiont, produces a bacteriocin against *Xanthomonas albilineans*, a sugar cane pathogen. *Research in Microbiology*, 153: 345-351.
- Sánchez, A.; De León, C.; Aranda, S.; Zabaleta, E.; Nova, C.; H. Godwin, P.; Leyva, S. (2018) Bacterias endófitas de la raíz en líneas de maíces tolerantes y susceptibles a sequía. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36. DOI 10.18781/R.MEX.FIT.1710-3.

Resultado 4. Capacitados especialistas y socializados los resultados del proyecto en diferentes sectores científicos y productivos

Actividades

4.1 Talleres, charlas, plegables y días de campo con los actores involucrados y productores

*En el 2018, durante la Misión a Argentina se impartió una Conferencia sobre experiencias cubanas en caña de azúcar con el endófito *Gluconacetobacter diazotrophicus* cepa 166-INICA, en la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC) e Instituto de Tecnología Industrial del Noroeste Argentino (ITANOA). La que llevó por título: "TRAYECTORIA DEL TRABAJO DESARROLLADO EN EL INICA CON LA BACTERIA ENDÓFITA *GLUCONACETOBACTER DIAZOTROPHICUS*"*

4.2 Presentación de resultados en eventos y publicaciones científicos.

En el 2019, se presentó un trabajo en el XXX Congreso de la sociedad Internacional de tecnólogos de la caña de azúcar, realizado en Tucumán, Argentina, con el título: Resistance induced by *Gluconacetobacter diazotrophicus* against leaf scald in sugarcane vitroplants que está incluido en los proceedings del evento, al cual se puede acceder en la página web de dicha organización.

Además, con este manuscrito se trabaja en la preparación de una publicación internacional en una revista con factor de impacto.

SINERGIAS CON EL OTRO PROYECTO PÉREZ GUERRERO DEL ICIDCA

✚Visita a la Universidad Tecnológica Nacional / Facultad Regional. Buenos Aires

Dr. José Luis Boiardi

Participante por Argentina

MSc. Ana Nelis San Juan

Participante por Cuba del ICIDCA

Lic. Marlyn Pérez

Participante por Cuba del ICIDCA

MSc. Juana de las M. Pérez

Participante por Cuba

Lic. Mario Alberto Casas

Participante por Cuba

Se realizó un encuentro en la Unidad de Investigación y Desarrollo de las Ingenierías de la Facultad Regional de la Universidad Tecnológica Nacional de Buenos Aires, con el Dr. en Ciencias Bioquímicas José Luis Boiardi. En el encuentro se expusieron los resultados obtenidos en el INICA con *Gluconacetobacter diazotrophicus*, prestando especial atención a los temas relacionados con la producción de metabolitos por el microorganismo. Por la parte argentina se centró la atención en la producción de fructanos, lo que generó el interés de presentar un nuevo proyecto de colaboración para el estudio de obtención de FOS y nanocelulosa bacteriana a partir de esta bacteria por parte del ICIDCA.

Limitantes encontradas: En cuanto a la adquisición de las dos laptop y la moto se revisaron las ofertas y aprobaron, se contrataron y estamos a la espera de su llegada al país.

III – INFORME ADMINISTRATIVO CONTABLE

1. Resumen de la situación financiera.

Del desembolso recibido a la cuenta de la institución equivalente a 23000 USD, se han ejecutado 17906.05 USD quedando en cuenta bancaria 5093.95 USD

Firma Director proyecto

Nombre: María La O Hechavarría

Fecha: 15 de noviembre de 2019