

Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo



INFORME FINAL DE PROYECTO

Proyecto: Moléculas con actividad biológica aplicadas a caña de azúcar y los microorganismos asociados al cultivo

PROYECTO DE COLABORACIÓN:

“Moléculas con actividad biológica aplicadas a caña de azúcar y los microorganismos asociados al cultivo.”

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

Entidad Ejecutora: Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA)

Contraparte Extranjera:

Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo (FCN), Argentina.

Laboratorio GeMBio del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C, Mexico

1. CARACTERIZACIÓN DEL PROYECTO.

1. Líneas de Acción.

Aplicación de producto de origen natural para incrementar el crecimiento y la resistencia de plantas *in vitro*.

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

2. Entidad local cubana responsable.

Nombre y Dirección: Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Carretera CUJAE Km 1^{1/2}. Boyeros. La Habana

Nombre del responsable y sus funciones: Dr. Ricardo Acevedo Rojas. Jefe del Proyecto, Investigador Titular, Jefe Dpto. Desarrollo de la Ciencia.

3. Objetivo General.

Analizar la actividad biológica de moléculas esteroidales en caña de azúcar y sus microorganismos asociados.

4. Objetivos Específicos

1. Establecer las concentraciones inhibitorias o sinérgicas de moléculas esteroidales con diferentes grupos bacterianos.
2. Evaluar la actividad promotora de crecimiento y brotación de moléculas esteroidales en brotes *in vitro* de caña de azúcar en sistemas de inmersión temporal.

3. Determinar el efecto de la interacción de moléculas esteroidales y bacterias endófitas mediante análisis histológicos y moleculares en los brotes in vitro de caña de azúcar.

5. Presupuesto inicial: 20 000.00 USD

Fecha de inicio de proyecto: marzo 2020

Fecha de finalización de proyecto: marzo 2022

Los cambios fundamentales que ejercerán los resultados de este proyecto están dados en:

- Establecimiento de vitroplantas de caña de azúcar para semilla con mayor vigor y adaptabilidad.
- Disminución del uso de fertilizantes y plaguicidas lo que permitirá la conservación de los suelos y el medioambiente.

Período del informe: El informe comprende todo el período de desarrollo del Proyecto, desde el inicio del mismo hasta su culminación (más de 2 años de trabajo).

2. INFORME TÉCNICO

La caña de azúcar (*Saccharum* spp.) es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial, distribuido en 100 países sobre un área de 26 millones de hectáreas de tierras cultivadas (Portal Caña, 2018). En esta especie vegetal la biotecnología constituye una herramienta importante para el mejoramiento genético y la propagación masiva (Wekesa *et al.*, 2015). Los Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) (Escalona *et al.* 1999) se utilizan para la propagación *in vitro* de la caña de azúcar a nivel mundial (Lorenzo *et al.*, 2001; Aragón *et al.*, 2009). Cambios tecnológicos al proceso de propagación de la caña de azúcar en BIT los realizaron Santana *et al.* (2014), donde lograron incrementar la eficiencia, rentabilidad y disminución de costos del proceso. No obstante, se puede mejorar el proceso de propagación con el empleo de sustancias naturales que favorezcan el desarrollo fisiológico del material vegetal que se obtenga por esta vía.

Los brasinoesteroides (BRs) son sustancias sintetizadas por las plantas y se encuentran principalmente en polen, hojas, yemas, flores y semillas a muy bajas concentraciones (Hernández y García-Martínez, 2016), participan en procesos como la diferenciación vascular, la elongación del tallo, tiempo de senescencia y floración, desarrollo de las hojas, defensa de la planta, así como la resistencia al estrés biótico y abiótico (Salgado *et al.*, 2008; Bajguzy Piotrowska-Niczyporuk, 2014; Calil y Fontes, 2016). El descubrimiento de estas sustancias por Mitchel *et al.* (1970) incentivó diversas investigaciones alrededor de todo el mundo en distintos cultivos agrícolas. En todos los casos se encontró un incremento del rendimiento (Coll *et al.*, 1999; Núñez *et al.*, 2004).

Los brasinoesteroides son compuestos vegetales que tienen la capacidad de estimular el crecimiento de las plantas. Influyen en diferentes procesos vitales de las plantas. Por tanto, la aplicación de los Br pueden inducir un amplio rango de respuestas, incluyendo un incremento en la expansión celular de las hojas, aumento de la elongación del tallo, crecimiento del tubo polínico, desenrollo de las hojas, formación de tejido conductor, intervienen en la fotomorfogénesis, en la división celular, indistintamente pueden estimular o inhibir la rizogénesis, participan en la inducción de la biosíntesis de etileno (Hu *et al.*, 2000; Nemhauser y Chory, 2004; Singh y Shono, 2005; Reyes *et al.*, 2008).

Además de su impacto en el crecimiento y desarrollo de las plantas, los brasinoesteroides juegan un papel importante en la tolerancia al estrés biótico y abiótico, tales como la resistencia a enfermedades, tolerancia a la sequía, salinidad, calor, frío, pesticidas y metales pesados entre otros (Bajguz y Hayat, 2009; Gomes, 2011; Vriet *et al.*, 2012).

En Cuba, se realizaron experimentos con análogos de BRs sintetizados en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Química de la Universidad de La Habana conocidos comercialmente como BIOBRAS 6 y MH-5. En café, plátano y lechuga, estas sustancias en combinación con auxinas y citoquininas estimularon la inducción de la formación de callos y brotes cuando se añadieron a determinadas concentraciones (García *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 1998 y Núñez *et al.*, 2004).

RESULTADOS Y PLANIFICACIÓN DE LAS ACTIVIDADES PRINCIPALES				
Resultados Planificados	Actividades Principales	Inicio	Térm.	Indicadores verificables.
Evaluación de relaciones de sinergismo o antagonismo in vitro de moléculas esteroidales con microorganismos aislados de caña de azúcar.	Ensayos "in vitro" con 5 grupos bacterianos para determinar relaciones sinérgicas o antagónicas	01/2020	06/2020	Evidencias gráficas y registros de laboratorio
	Análisis estadístico de los resultados y elaboración de informe.	06/2020	06/2020	Informe de etapa concluida
Determinación de actividad promotora de crecimiento y brotación en caña de azúcar	Montaje de ensayos en Bioreactores de Inmersión Temporal (BIT) con diferentes concentraciones de inductores (moléculas esteroidales, Gd e inductor tradicional empleado en la biofábrica)	02/2020	11/2020	Evidencias gráficas de los ensayos y registros lab.
	Determinación del efecto de los inductores en las fases de multiplicación y enraizamiento. Se medirán altura de los brotes, coeficiente de multiplicación, así como la velocidad de enraizamiento	06/2020	11/2020	Análisis estadísticos de los resultados.
	Determinación del efecto de los inductores en la fase de adaptación. Se medirá el porcentaje de supervivencia, tamaño de las hojas y altura de las plantas.	01/2021	09/2021	Análisis estadísticos de los resultados.
Caracterización histológica y molecular de los brotes in vitro multiplicados bajo la acción de moléculas esteroidales	Montaje de ensayos en Bioreactores de Inmersión Temporal (BIT) de las interacciones de moléculas esteroidales, y vitroplantas. Toma de muestras para	01/2020	6/2020	Análisis estadísticos de los resultados.

	histología y biología molecular.			
	Análisis integral de los resultados moleculares e histológicos.	07/2021	12/2021	Análisis de los resultados. Informe integral del proyecto.
Capacitación y socialización de resultados	Realización de talleres, charlas y plegables sobre los resultados	10/2021	03/2022	Actas de participación
	Presentación de resultados en congresos y revistas científicas	10/2021	03/2022	Certificados y cartas editoriales

RESULTADO PLANIFICADO I: Evaluación de relaciones de sinergismo o antagonismo in vitro de moléculas esteroidales con microorganismos aislados de caña de azúcar.

Para el trabajo se utilizaron aislamientos de bacterias endófitas 19, 23, 24 y 25 obtenidas en el área experimental de la Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar (ETICA) de Ranchuelo, provincia Villa Clara a partir de la hoja+3 del cultivar C86-12. Se emplearon además las cepas 8-INICA y 166-INICA (fijadoras de nitrógeno y promotoras del crecimiento de las plantas) y la cepa Xa39 (agente causal de la enfermedad escaldadura de la hoja), procedentes de la Colección de Cultivos microbianos del Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar.

Microorganismos empleados en el estudio

Aislamientos	Gram	Género
19-18		
23-18	negativo	
24-18	negativo	
25-18		
8-INICA	negativo	<i>Azospirillum brasilense</i>
166-INICA	negativo	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>

Aislamientos	Gram	Género
Xa39	negativo	<i>Xanthomonas albilineans</i>

Las cepas 19, 23, 24, 25 y 8-INICA se sembraron en medio Caldo Nutriente e incubaron a 30 grados Celsius por 48h. Las cepas 166-INICA y Xa39 se sembraron respectivamente en los medios Papa P (bibliografía) y Wilbrinck (bibliografía) líquidos e incubaron en las condiciones antes descritas. A partir de los medios líquidos crecidos con los diferentes microorganismos, se inocularon por triplicado 0,1 mL de la suspensión de 10^8 cel.mL⁻¹ en placas de Agar Nutriente, Papa P y Wilbrinck con y se esparcieron con espátula de drigalsky para lograr una mayor uniformidad de crecimiento.

Se emplearon los análogos de brasinoesteroides Do (Diosgenina), D1 (Di-31), M1 (MH5) y T1 (Triol), los que se encontraban en solución alcohólica a una concentración de 1mg/mL. En el estudio se utilizaron 4 diluciones del producto y como control agua destilada estéril. Se realizaron además controles de esterilidad a los medios de cultivo y productos empleados.

1. 0,1 mg/mL
2. 0,01mg/mL
3. 0,001mg/mL
4. 0,0001mg/mL

Se utilizaron ponches de papel de filtro estériles, se embebieron en las diferentes concentraciones de los productos, se colocaron en la superficie de las placas que tenían las suspensiones celulares y se incubaron a 30 grados Celsius. Las observaciones se realizaron 24 y 48 horas.

Resultados

No se observaron relaciones antagónicas, ni sinérgicas entre las diferentes diluciones de los análogos de brasinoesteroides y las cepas 8-INICA de *Azospirillum brasilense*, 166-INICA de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, Xa39 de *Xanthomonas albilineans* y los aislamientos endófitos 23 y 25.

Las cepas 19 y 24, no mostraron relaciones antagónicas con ninguno de los productos empleados, sin embargo mostraron una relación sinérgica con el análogo de brasinoesteroide T1 en las diluciones empleadas.

Resultados de la interacción de las cepas 19 y 24 con el análogo de brasinoesteroide T1.

Cepa 19 (24h)		
producto	dil.	Replicas

Cepa 24(24h)		
producto	dil.	replicas

		1	2	3
T1	1	+	+	+
	2	+	+	+
	3	-	+	+
	4	-	-	-

		1	2	3
	1	+	+	-
	2	+	+	-
	3	+	+	-
	4	-	-	-

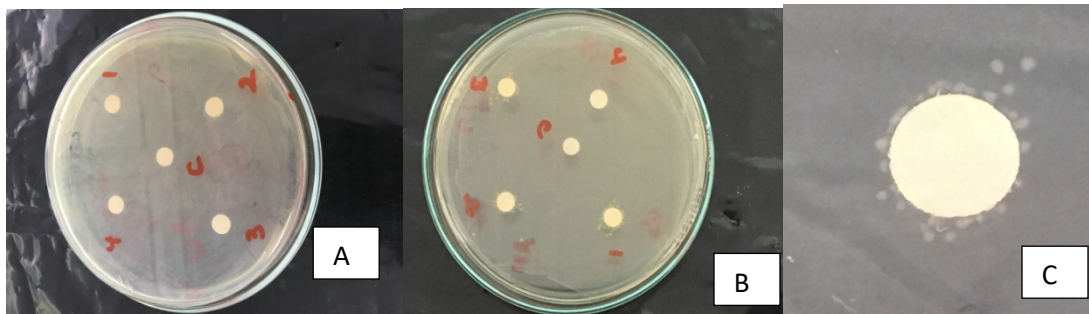
Cepa 19 (48h)				
producto	dil.	Replicas		
		1	2	3
T1	1	+	+	+
	2	+	+	+
	3	+	+	+
	4	-	-	-

Cepa 24 (48h)				
producto	dil.	Replicas		
		1	2	3
T1	1	+	+	-
	2	+	+	-
	3	+	+	-
	4	+	+	-

- No interacción

+Se observa una estimulación del crecimiento de las cepas alrededor del ponche que contiene el análogo de brasinoesteroide.

En las siguientes figuras se observan las interacciones obtenidas en el estudio.



En la figura A se observa que no existe interacción entre la cepa y los productos empleados, en la figura B se observa un crecimiento abundante de colonias del microorganismo alrededor del análogo de brasinoesteroide T1, en la figura C se observa una ampliación de la interacción positiva observada.

RESULTADO PLANIFICADO II: Determinación de actividad promotora de crecimiento y brotación en caña de azúcar.

- Montaje de ensayos en Bioreactores de Inmersión Temporal (BIT) con diferentes concentraciones de inductores (moléculas esteroidales, Gd e inductor tradicional empleado en la biofábrica)

El trabajo se desarrolló con el objetivo de evaluar dos concentraciones del análogo de BRs MH-5 y su combinación con la hormona 6-bencilaminopurina (6-BAP) sobre el crecimiento de vitroplantas del cultivar C90-469 en la fase de multiplicación.

Materiales y Métodos

Se emplearon vitroplantas de caña de azúcar, cultivar C90-469, obtenidas en Bioreactores de Inmersión Temporal (BIT) en la Biofábrica perteneciente a la Estación Territorial de Investigación de la Caña de Azúcar (ETICA) Villa Clara.

La composición del medio de cultivo líquido empleado en la fase de multiplicación de las vitroplantas fue la descrita por Murashige y Skoog (1962) (MS) al 100% SUPLEMENTADO con 30 g L⁻¹ de sacarosa, ácido ascórbico 50 mg L⁻¹ y 6-BAP a 4 mg L⁻¹ en los tratamientos que lo requieran. El pH se ajustó a 5,6 con NaOH (1,0 N) y HCl (1,0 N) previo a la esterilización que se realizó mediante ebullición durante cuatro minutos.

Los tratamientos utilizados consisten en la variación de la concentración del estimulador MH-5 en combinación con la hormona 6-BAP, se realizaron 10 réplicas para un total de 50 tubos con vitroplantas (Tabla 1).

Tabla 1: Tratamientos evaluados en la investigación.

	Tratamiento	Concentración de MH-5 (mgL ⁻¹)
1	Medio de cultivo con 6-BAP (control)	-
2	Medio de cultivo sin 6-BAP	0,001
3	Medio de cultivo con 6-BAP	0,001
4	Medio de cultivo sin 6-BAP	0,01
5	Medio de cultivo con 6-BAP	0,01

A los 25 días de multiplicación de las vitroplantas de caña de azúcar se evaluó la longitud de los brotes, número de hojas y el coeficiente de multiplicación. Los datos se

procesaron con un Análisis de Varianza de Clasificación Simple (ANOVA) y la diferencia entre el cuadrado medio de los grupos se determinó por la prueba de Tukey (1949) para $p \leq 0,05$ con el software STATISTICA v.8 (StatSoft, 2007).

Resultados y discusión

El cuadrado medio de las variables longitud, número de hojas activas y coeficiente de multiplicación de los brotes *in vitro* de caña de azúcar fue mayor en el tratamiento 3 (medio de cultivo con hormona y $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ de MH-5) con diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos y los controles (Figura 1).

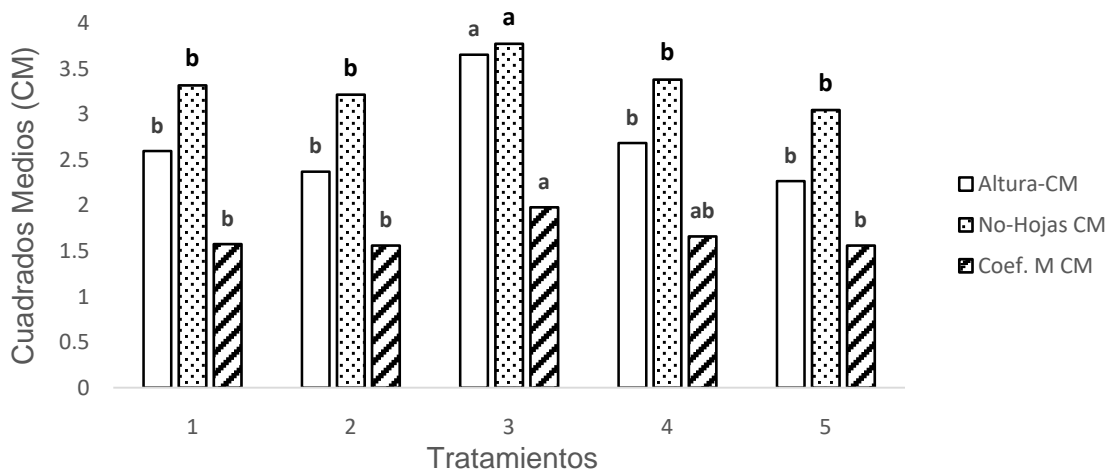


Figura 1: Comparación de los cuadrados medios de las variables: longitud, número de hojas activas y coeficiente de multiplicación (Coef.M) de los brotes *in vitro* de caña de azúcar entre los 5 tratamientos utilizados. Letras diferentes denotan diferencias significativas $p \leq 0,05$.

Los resultados experimentales en presencia de la hormona 6-BAP, demostraron la efectividad de la baja concentración del brasinoesteroide ($0,001 \text{ mg L}^{-1}$) para estimular los procesos fisiológicos en los brotes de caña de azúcar. En cambio con $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ no hubo diferencias significativas con respecto al control, lo que contrasta con lo informado por Plana *et al.* (2002), que encontró el efecto estimulador de un brasinoesteroide comercializado como Biobrasa concentraciones de 10^{-4} , 10^{-3} y $10^{-2} \text{ mg L}^{-1}$, en presencia o no de 6-BAP en el cultivo *in vitro* de tomate.

La presencia de la hormona 6-BAP fue determinante para lograr el efecto deseado de estimulación del crecimiento en los brotes *in vitro* de caña de azúcar, a una baja concentración del brasinoesteroide, de acuerdo a los resultados del ANOVA, donde no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos 2 y el control. Un

experimento con resultados semejantes se realizó por Núñez *et al.* (2004) para evaluar el efecto del Biobras-6 y el MH-5 en la inducción de callos y brotes en lechuga (*Lactuca sativa L.*). Los resultados demuestran que los análogos de brasinoesteroide estimulan la formación de callos y brotes a partir de cotiledones solamente cuando se añadieron, a determinadas concentraciones, al medio de cultivo con presencia de 6-BAP 0.1 mg L^{-1}

La ausencia en el tratamiento 2 de la hormona 6-BAP demostró que la actividad citoquinínica de MH-5 no es suficiente para elevar el coeficiente de multiplicación, aunque esté presente el homólogo de brasinoesteroide a bajas concentraciones. Este resultado coincide con lo informado por Fé *et al.* (1998), los que utilizaron la hormona 6-BAP en el medio de cultivo para estimular el crecimiento de los brotes del cultivar C1051-73 de caña de azúcar en la fase de multiplicación.

El papel de las auxinas y citoquininas en el medio de cultivo es esencial para el desarrollo de los brotes, esto se documentó por Yokoya & Handro (1996, 1997) donde observaron que estas hormonas endógenas promueven el crecimiento de segmentos de regiones apicales en *Grateloupia dichotoma*. Núñez *et al.* (2004) plantearon que el contenido hormonal endógeno de los explantes y la citoquinina añadida al medio equilibran la relación auxina/citoquinina y ocurre una adecuada división y diferenciación celular en la planta, esta relación también se favorece por la adición de análogos de BRs, los cuales estimulan ambos procesos fisiológicos

El análogo de BRs MH-5 a una concentración de $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ y su combinación con la hormona 6-bencilaminopurina (6-BAP) incrementó el crecimiento en vitroplantas del cultivar C90-469 en la fase de multiplicación.

- Determinación del efecto de los inductores en las fases de multiplicación, enraizamiento y adaptación

Se montaron ensayos con vitroplantas de caña de azúcar, cultivar C1051-73, en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) en la Biofábrica de la ETICA de Villa Clara.

Las moléculas análogas de brasinoesteroides que se emplearon fueron el MH-5 (M1) y Triol (T1) a una concentración de 1 mg/mL obtenidos en el laboratorio Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Química de la Universidad de la Habana.

Se midieron largo de tallos, cantidad de hojas, cantidad de raíces y largo de las mismas.

Resultados

ETAPA DE MULTIPLICACIÓN

tallo-cm	SS	Degr.	MS	F	p	tratamiento	tallo-CM	
----------	----	-------	----	---	---	-------------	----------	--

		of						
tratamiento	12,211	2	6,106	9,240	0,000156	1	3,583	b
REPETICION	4,422	9	0,491	0,744	0,668518	3	3,750	b
Error	111,011	168	0,661			2	4,200	a
cant-hojas	SS	Degr. of	MS	F	p	tratamiento	CANT-HOJAS	
tratamiento	36,2763	2	18,1382	33,047	0,000000	1	1,118	b
REPETICION	2,1656	9	0,2406	0,438	0,912676	3	2,030	a
Error	92,2076	168	0,5489			2	2,107	a
cant-raices	SS	Degr. of	MS	F	p	tratamiento	CANT-RAICES	
tratamiento	1185,033	2	592,5177	73,5194	0,000000	1	2,350	c
REPETICION	19,200	9	2,133	0,2647	0,983094	2	6,417	b
Error	1353,967	168	8,059			3	8,533	a
raíz-mayor	SS	Degr. of	MS	F	p	tratamiento	root-mayor	
tratamiento	70,9848	2	35,4924	49,9792	0,000000	1	0,687	b
REPETICION	3,1769	9	0,3530	0,4971	0,875047	3	1,922	a
Error	119,3041	168	0,7101			2	2,098	a

ETAPA DE ENRAIZAMIENTO

tallo-cm	SS	Degr.	MS	F	p	tratamiento	tallo-CM	
----------	----	-------	----	---	---	-------------	----------	--

		of						
tratamiento	12,211	2	6,106	9,240	0,000156	1	3,583	b
REPETICION	4,422	9	0,491	0,744	0,668518	3	3,750	b
Error	111,011	168	0,661			2	4,200	a
cant-hojas	SS	Degr. of	MS	F	p	tratamiento	CANT-HOJAS	
tratamiento	36,2763	2	18,1382	33,047	0,000000	1	1,118	b
REPETICION	2,1656	9	0,2406	0,438	0,912676	3	2,030	a
Error	92,2076	168	0,5489			2	2,107	a
cant-raices	SS	Degr. of	MS	F	p	tratamiento	CANT-RAICES	
tratamiento	1185,0332	2	592,517	73,5194	0,000000	1	2,350	c
REPETICION	19,200	9	2,133	0,2647	0,983094	2	6,417	b
Error	1353,967	168	8,059			3	8,533	a
raíz-mayor	SS	Degr. of	MS	F	p	tratamiento	root-mayor	
tratamiento	70,9848	2	35,4924	49,9792	0,000000	1	0,687	b
REPETICION	3,1769	9	0,3530	0,4971	0,875047	3	1,922	a
Error	119,3041	168	0,7101			2	2,098	a

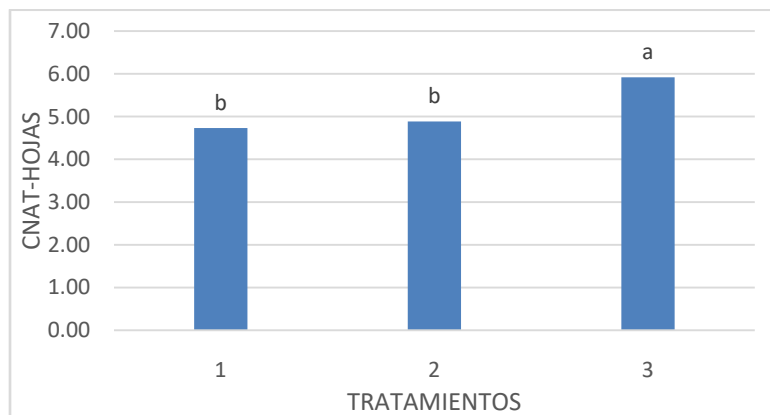
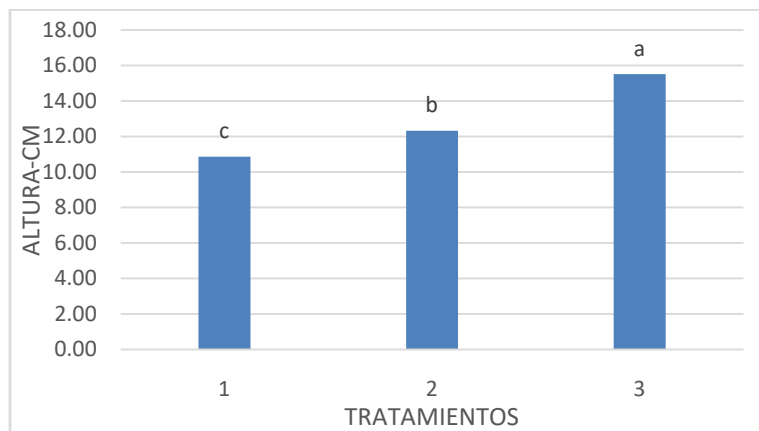


Brotos de caña de azúcar del cultivar C95-416 a los 15 días de enraizamiento.

ETAPA DE ADAPTACIÓN

Se pasaron las plantas a la fase de adaptación en invernadero y se midió altura de las plantas cantidad de hojas y coeficiente de supervivencia

Al analizar los datos estadísticamente se comprobó que continuó siendo las plantas tratadas con el Triol (T1) las que mejor desarrollo presentaron.



El Triol (T1) fue la molécula esterooidal que más funcionó y provocó mayor crecimiento y desarrollo de la plantas en la fase de enraizamiento, ahorrando una semana de trabajo

con un ahorro considerable de tiempo y gastos en reactivos, materiales y energía eléctrica. Ya que se acelera el desarrollo de las plantas. Además estas en la fase de adaptación en el invernadero crecen con mayor vigor y resistencia, lo que hace que puedan comercializarse con mayor prontitud y mejores condiciones adaptativa.

RESULTADO PLANIFICADO III: Caracterización histológica y molecular de los brotes in vitro multiplicados bajo la acción de moléculas esteroidales

- Determinar el efecto de la interacción de moléculas esteroidales mediante análisis moleculares

Para la caracterización molecular se realizó la extracción de ácidos nucleicos totales (ADNARN) y se empleó 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) y se almacenaron a – 20oC hasta su uso. Se sintetizó el ADN complementario (ADNc) con el Sistema de Transcripción Reversa (Promega), según las recomendaciones del fabricante.

Para la amplificación de los fragmentos de interés se partió de 25 ng de ADNc y ácidos nucleicos totales, respectivamente, los que se mezclaron con 0,3 µL de cada cebador a 25 pmol, 2,5 µL de tampón 5x, 1,25 µL de MgCl₂, 0,4 µL de dNTPs 10 mM, 0,4 µL de la enzima Taq polimerasa (5U/µL) (Heber Biotec) y 18,45 µL de agua libre de RNAsas para ajustar a un volumen final de 25 µL.

Se utilizaron nueve pares de cebadores para genes de resistencia (genes R) diseñados por el INICA (Tabla 1), basados en el análisis de 243 secuencias previamente informadas sobre la interacción caña de azúcar - *Sporisorium scitamineum* (La O et al., 2008; Thokoane et Rutherford, 2001).

Tabla 1: Secuencia de cebadores, temperatura de alineamiento (T_m) y tamaño esperado del producto de amplificación.

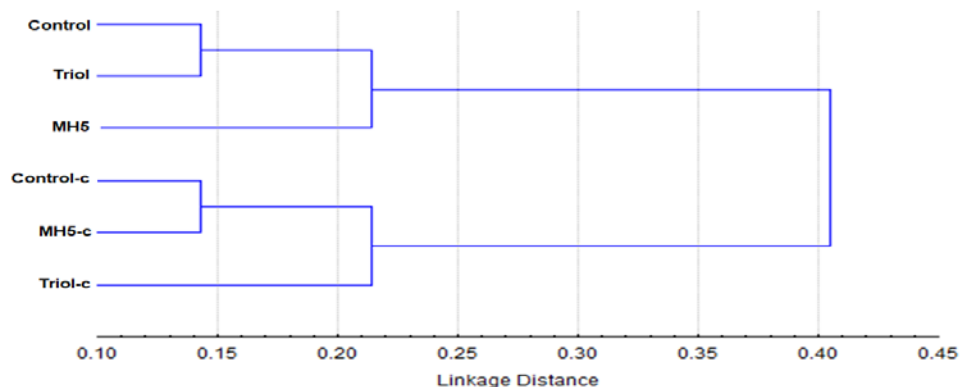
Nombre	Descripción	Secuencia (5´-3´)	T_m (°C)	Talla (pb)
Cu-79	Hidrolasa	GCGAAGGCGTGCGACAAG GCCAATGGACCACCAGTTGC	52	308
Sa1-17	Endopeptidasa, superfamilia nucleótido N-terminal	CCTTCAATGTGCTCGGTGGG GCGAACACATCCTTAAGTAGAT CG	54	236
Cu-37	Factor de elongación	CCACTGTAAGATTCCCGGAGAT G CACGATTAACATGTGGAACATC AC	54	287

Cu-33	Promotor de crecimiento independiente de auxina	GGTCCATTGGTCCCCTTGATC CGAGTTGTTGCTTGTATCTCAG G	54	202
Cu-38	Proteína de transporte	GGGTAGCACACGCGAGAGAGG GCTTTCGGAGAGACTGGCTGG	54	358
Sa2-31	Endoglucanasa, glicosil hidrolasa familia 9	GGAAGGCCAACATGGTTTCAG CACTGCACTGCTGCTGTCC	56	311
Cu-41	Proteína quinasa	CGGCGTGTACAGCTTCTGC GACCATGCGCTCCACGG	56	217
Sa2-24	Xilosa isomerasa	CCAGAGCTTTGACAGTGAGATT GG CCCATGGTGAGGACGACTGC	56	227
Cu-29	Proteína de unión a ácidos nucleicos	GCAACAACCTATGGCGCAAAC CGTGAGGATGGGATGCAGAG	54	286

La reacción se realizó con el siguiente programa 94oC por 3 min, seguido de 30 ciclos a 94oC por 30seg, 52, 54 ó 56 (según el gen a evaluar) por 30seg y 72oC por 1min, seguido de una extensión final de 72oC por 10 min. Todos los productos de las PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2%, se tiñeron con Gel red (0,5µg/ml), los productos obtenidos se visualizaron en un transiluminador.

Para cada combinación de cultivar -gen - tratamiento, los datos se puntuaron como "1" para "presencia" y "0" para "ausencia". Con el empleo del software NTSYSpc v2.1 se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico basado en la matriz de covarianza genética estimada, mediante el método de la media aritmética de grupos pareados desbalanceados (UPGMA) y coeficiente de disimilitud como medida de la diferencia entre grupos. Se tuvo en cuenta no fusionar conjuntos demasiado lejanos, como criterio de parada del agrupamiento.

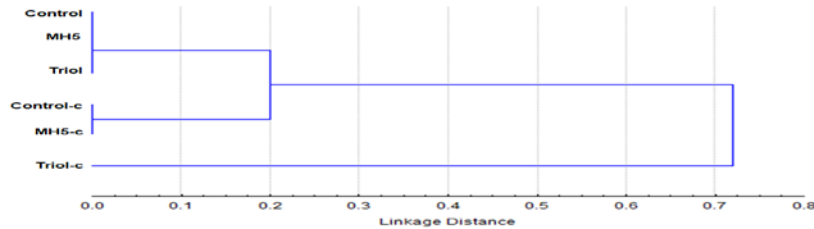
Etapa de MULTIPLICACIÓN



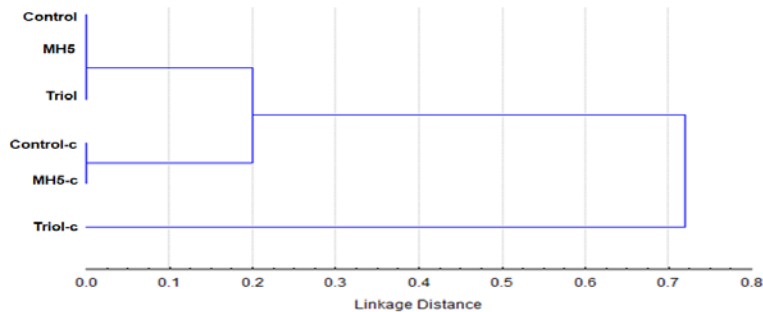
Se determinaron diferencias en ADNc (Triol en relación con control y MH5)

- ✓ Cambios en el procesamiento de Cu-79 (función hidrolasa)
- ✓ Inhibición de Cu-33 (Promotor de crecimiento independiente de auxin)

Etapa de Enraizamiento



Se encontraron diferencias entre ADNt (genes constitutivos) y ADNc (genes inducibles). Con una Inhibición de Cu-33 (Promotor de crecimiento independiente de auxina). (Vías de las auxinas).



Se vieron diferencias en ADNc (Triol en relación con control y MH5). Así como cambios en el procesamiento de Cu-29 (proteína de unión a ácidos nucleicos). Se produce inhibición de Sa2-31 (Endoglucanasa, glicosil hidrolasa familia 9. Estos son mecanismos de regulación que favorecen el crecimiento vegetal.

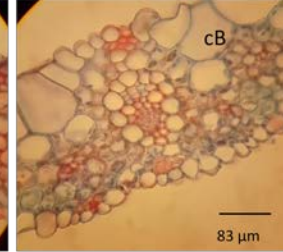
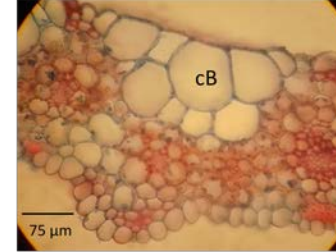
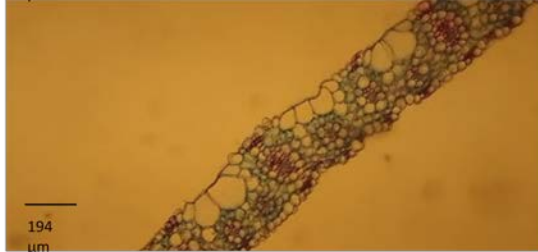
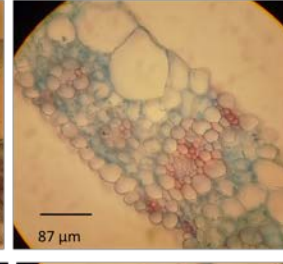
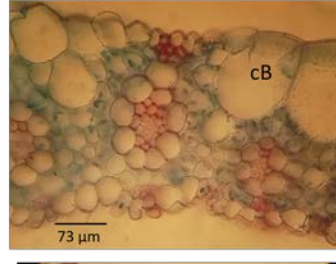
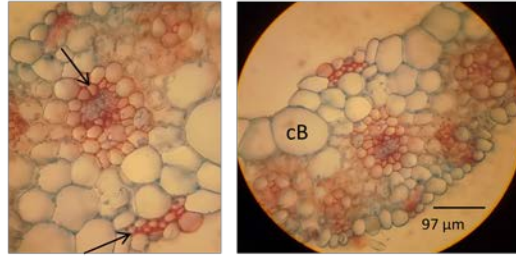
Se pudo concluir que las moléculas esteroidales modifican el perfil de expresión de genes de resistencia (R) con posible estimulación de una vía dependiente de auxinas en vitroplantas de caña de azúcar. Además el producto Triol activa mecanismos de regulación génica que favorecen el desarrollo vegetal en las etapas de multiplicación y enraizamiento de vitroplantas de caña de azúcar.

- Determinar el efecto de la interacción de moléculas esteroidales mediante análisis histológicos

Se realizaron cortes transversales, a mano alzada con hojas de afeitar bajo lupa, de diferentes fragmentos de láminas de caña, crecidas en Bio-reactores de Inmersión Temporal (BIT). Los cortes se colorearon utilizando: Azul astral – safranina (doble tinción).Lugol, test histoquímico para detección de almidón. Medio de montaje y observación: agua-glicerina (1:1) y microscopio óptico Leica DM500

RESULTADOS

- **Tratamiento 1 (control)** enraizam.
- Menor lignificación de los tejidos.
- Células buliformes de tamaño pequeñas
- Menor espesor de semilámina (225/175 μm)



Valores promedio del espesor de semilámina de hoja de caña de azúcar, crecidas en medio de multiplicación y enraizamiento con los diferentes tratamientos.

	Tratamiento	Zona media espesor de semilámina	Zona lateral espesor de semilámina	Tamaño cel. Buliforme (largo/ancho)
Multiplicación	CONTROL	325 (300-362) μm	175 (162-187) μm	92 μm x 76 μm
	MH-5	237 (200-262) μm	150 (137-162) μm	89 μm x 91 μm
	TRIOIOL	212,5 (200-237) μm	162 (150-175) μm	92 μm x 92 μm
Enraizamiento	CONTROL	225 (200-237) μm	175 (150-187) μm	76 μm x 69 μm
	MH-5	237 (225-250) μm	162 (150-187) μm	82 μm x 76 μm
	TRIOIOL	275 (237-300) μm	175(150-200) μm	92 μm x 82 μm

Se observó un **incremento** del tamaño de las **células buliformes** en las plantas con **brasinoesteroides** con respecto a las controles, siendo **mayor** en el **medio de multiplicación**.

Disminución del espesor de semilámina en aquellas plantas tratadas con **brasinoesteroides** crecidas en medio de **multiplicación**. En las crecidas en medio de **enraizamiento** hay un **incremento** del **espesor de semilámina**, sobre todo en la zona media.

En BIT con **medio de multiplicación**, la presencia de **MH-5** promueve el **aumento de lignificación** de los tejidos, mientras que la presencia de **trioi**, **disminuye la lignificación** de los mismos tejidos.

En BIT con **medio de enraizamiento**, la presencia de **MH-5** produce un **aumento de lignificación** similar al observado en el medio de multiplicación, mientras que en presencia de **trioi**, el **incremento de lignificación** de los tejidos es **superior** al observado en todos los tratamientos.

- Escalado de los resultados en la biofábrica de caña de azúcar

Durante el escalado en Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) de brasinoesteroides en el proceso de propagación *in vitro* de la caña de azúcar en la fase de enraizamiento se

utilizaron los cultivares C95-416 y la C97-445 que se encontraban en propagación en la Biofábrica. Para lo cual se utilizó el brasinoesteroide MH-5 (**0.001 mg L⁻¹**) por resultar la mejor concentración durante toda la etapa experimental. Como control se empleó el medio de enraizamiento.

Se debe señalar que se empleó el cultivar C95-416 debido a los problemas presentados por el mismo en la fase de enraizamiento en todo el proceso productivo, su principal dificultad radica en la emisión de raíces en esta etapa.

Datos del Experimento

Fecha de montaje del experimento: 25/5/2021

Fecha de evaluación: 10/6/2021

Cultivar: C95-416

Densidad de inóculo por SIT: 50 explantes por SIT

Total de SIT empleados: 25 Sistemas de Inmersión Temporal (SIT)

Material inicial: 1250 explantes

Material Final: 3750 explantes

Coefficiente de Multiplicación: 3

Resultados del escalado cultivar C95-496

La emisión de los primeros primordios radiculares (raíces) comenzó a observarse a los siete de montados (SIT) a diferencia del tratamiento control. Además, el material estuvo listo para salir a la fase de aclimatización a los 15 días a diferencia del control que demoró 21 días. Desde el punto de vista de su aplicación la utilización de brasinoesteroides acorta el tiempo de la fase de enraizamiento del material vegetal, lo cual repercute también desde el punto de vista económico.



Figura 11. Plantas *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp) cv. C97-445 en fase de aclimatización *ex vitro* (umbráculo) a los 50 días después del trasplante.

RESULTADO PLANIFICADO IV: Capacitación y socialización de resultados

- Se desarrolló un Taller de cierre de Proyecto para divulgar los resultados. Donde se presentaron los mismos por los diferentes participantes del mismo.(Se anexa programa)
- Charlas para capacitación de personal biofábrica
- Se impartió curso teórico-práctico en la Estación experimental del INICA de Santiago de Cuba. “Evaluación interdisciplinaria del estrés biótico/abiótico en plantas superiores y su relevancia para el mejoramiento genético”
- Está en preparación un artículo para presentar en un congreso y publicar en revista.

Las Misiones planificadas para el 2020 fueron pospuestas para el 2021 debido a la Pandemia de Covid-19. Se realizaron dos acciones:

1. Dos especialistas cubanos viajaron a Argentina, para completar los estudios moleculares e histológicos
2. Una especialista argentina viajó a Cuba, para integrar los resultados de histología, participar en el Taller del Proyecto e impartir un Curso relacionado con las técnicas histológicas empleadas para el análisis de las muestras de tejidos estudiados.

CONCLUSIONES GENERALES

- Los microorganismos ensayados (bacterias) no ejercieron efecto significativo sobre la actividad de las moléculas biológicas en caña de azúcar.

- Los Brasinoesteroides, **MH5 y Triol**, fueron ajustados a una dosis muy baja, la menor para su utilización

- El **MH-5** en los bioreactores de inmersión temporal (BIT) con medio de **MULTIPLICACIÓN** promueve el **aumento de lignificación** de los tejidos y el **TRIOL**, aumenta la celulosa en los mismos tejidos.

- El **MH-5** en los BIT con medio de **ENRAIZAMIENTO** produce un **aumento de lignificación** y el **TRIOL**, produce **incremento de lignificación** de los tejidos **superior** al observado en todos los tratamientos.

- Los resultados histológicos se correlacionaron con los moleculares y los de ensayos a campo. Se concluye que estos brasinoesteroide estimulan el crecimiento, acelerando el proceso de enraizamiento y el alargamiento caulinar, dos etapas diferentes en el desarrollo de vitroplantas. Esta tendencia también se mantuvo durante el escalado de diferentes variedades.

RECOMENDACIONES

De estos resultados se desprende algunas recomendaciones tendiente a mejorar la calidad del cultivo y a disminuir el tiempo de desarrollo de las vitroplantas durante el crecimiento en BIT.

- EMPLEAR EL **MH5** PARA MEDIO DE MULTIPLICACION
- **TRIOL** PARA MEDIO DE ENRRAIZAMIENTO

Un ejemplo para dar es el cultivar C95-416 (con dificultad para enraizar), mostró comportamiento positivo frente al TRIOL, generando raíces en tiempo adecuado

Esto podría recomendarse para variedades recalcitrantes que muestran dificultad para enraizar en el proceso de producción de vitroplantas.

Referencias Bibliográficas

Aragón, C.E., Carvalho, L.C., González, J., Escalona, M. y Amâncio, S. (2009). Sugarcane (*Saccharum* spp. *hibridum*) Propagated in headspace renovating systems shows autotrophic characteristics and develops improved anti-oxidative response. *Tropical Plant Biology*, 2:38-50.

Bajguz, A. and Piotrowska-Niczyporuk, A. 2014. Brassinosteroids implicated in growth and stress responses. En: L.-S. P. Tran y S. Pal (eds.), *Phytohormones: A windows to*

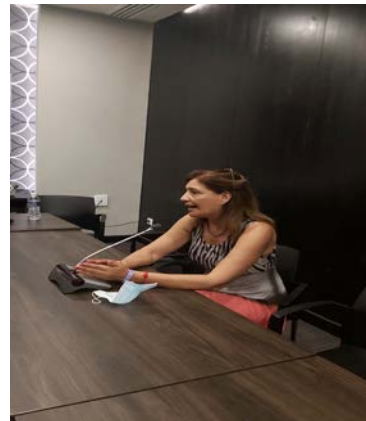
- metabolism. Signaling and Biotechnological Applications. Springer Science, Business Media. pp: 163-190.
- Calil, I. P., & Fontes, E. P. (2016). Plant immunity against viruses: antiviral immune receptors in focus. *Annals of botany*, 119(5), 711-723.
- Coll Y., Coll F., Amorós A. y Pujol M. (2015). Brassinosteroids roles and applications: an update. *Biologia* 70/6: 726—732, 2015.
- Coll, D., Diosdado, E., González, C., Romás, M. I., Xiqués, X., Coll, F., Pérez, R. y Echevarria, M. T. (1999). Efecto de tres análogos de brasinosteroides en el crecimiento y variabilidad genética del callo embriogénico de naranjo agrio (*Citrus aurantium*, L.). Resúmenes. En: Taller Internacional de Biotecnología Vegetal, BioVeg'99. La Habana, p. 5
- Escalona, M., Lorenzo, J. C., González, B., Daquinta, M., Fundora, Z., Borroto, C. G., Espinosa, D., Arias, E. y Aspiolea, M. E. (1999). New system for *in vitro* propagation of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr). *Pineapple News*,5: 5-7.
- Fé, C., Ortiz, R. y Jiménez, M. (1998). Aportes a la tecnología de micropropagación de caña de azúcar aplicada en cuba. II Efecto de análogos de Brasinoesteroides en la multiplicación, el enraizamiento y la adaptación de las vitroplantas. *Cultivos tropicales*, 19(3): 45-48.
- García, D., Marrero, M., Cuba, M. y Núñez, M. (1997). Efecto cualitativo de análogos de brasinoesteroides como sustitutos hormonales en la callogénesis de café (*Coffeacanephora* var. Robusta). *Cultivos Tropicales*, 18: 44-46.
- Hernández Silva, E., & García-Martínez, I. (2016). Brasinoesteroides en la agricultura. I. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(2), 441-450.
- Portal Caña (2018) Área cultivada en el mundo con caña de azúcar y principales productores. Recuperado en: <https://www.portalcania.com.ar>. Consultado el: 16 de octubre del 2018.
- Lorenzo, J.C., Blanco, M. A., Peláez, O., González, A., Cid, M., Iglesias, A., González, B., Escalona, M., Espinosa, P. y Borroto, C. (2001). Sugarcane micropropagation and phenolic excretion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65: 1-8.
- Mitchell, J. W., Mandava, N., Worley, J. F., Plimmer, J. R. y Smith, M. V. (1970). Brassin, a new family of plant hormones from rape pollen. *Nature*,225: 1065-1066.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiolog. Plantarum*, 15: 473-497.

- Núñez, M., Siquiera, J., Hernández, M., Zullo, M., Robaina, C. y Coll, F. (2004). Efecto del biobras-6 y el MH-5 en la inducción de callos y brotes en lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Cultivos Tropicales*, 25(4): 5-9.
- Plana, D., Álvarez, M., Florido, M., Lara, R. M. y Núñez, M. (2002). Efecto del Biobras 6 en la morfogénesis *in vitro* del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) var. Amalia. *Cultivos Tropicales*, 23(2): 21-25.
- Rodríguez, T., Núñez, M. y Vento, H. (1998). Influencia de un análogo de brasinosteroides en la fase de multiplicación *invitro* del banano (*Musa* spp.) variedad Gran Enano. *Cultivos Tropicales*, 19(2):19-22.
- Salgado, R., Cortés, M. A. y Del Río, R. E. (2008). Uso de brasinoesteroides y sus análogos en la agricultura. *México. Biológicas*, 10:18-27.
- Santana, I., Rodríguez, J., Nodarse, O., Bernal, A., Monte de Oca, J.L., Jiménez, M., Machado, P., Rolo, J.M., Pérez, A. y Zayas, C. (2014). Biofábrica de 5ta generación. En XXXVI Convención y EXPOATAM 2014 "Héctor M. Sáenz Couret", septiembre 2 al 5 de 2014. *Revista ATAM, México*. ISSN: 2007610: 10 p.
- Wekesa, S. N., Sangula, A. K., Belsham, G. J., Tjornehoj, K., Muwanika, V. B., Gakuya, F. y Siegismund, H. R. (2015). Characterisation of recent foot-and-mouth disease viruses from African buffalo (*Syncerus caffer*) and cattle in Kenya is consistent with independent virus populations. *BMC veterinary research*, 11(1), 17.
- Yokoya, N. S. y Handro, W. (1996). Effects of auxins and cytokinins on tissue culture of *Grateloupia dichotoma* (Gigartinales, Rhodophyta). *Hydrobiologia*, 326/327, 393- 400.
- Yokoya, N. S. y Handro, W. (1997). Thallus regeneration and growth induced by plant growth regulators and light intensity *Grateloupia dichotoma* (Rhodophyta). In T. Kitamura, (Ed.) *Proceedings of I.T.I.T. International Symposium on New Technologies from Marine-Sphere* (pp. 83-86). Takamatsu: Shikoku National Industrial Research Institute.

TALLER DE CIERRE E INTERCAMBIO DE RESULTADOS DEL PROYECTO
MOLECULAS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA APLICADAS A CAÑA DE AZÚCAR Y
MICROORGANISMOS ASOCIADOS AL CULTIVO
PROGRAMA 20 de junio de 2022

- 9:00-9:15. Introducción general. Importancia proyecto, objetivos y resultados esperados. (Dr. Ricardo Acevedo)
- 9:15-9:45. Interacciones de moléculas esteroidales con bacterias endógenas de la caña de azúcar(MSc. Juana Pérez)

- 9:45-10:15. Determinación de concentraciones más adecuadas de brasinoesteroides para su empleo en birreactores de inmersión temporal de vitroplantas de caña de azúcar(Lic. Mario Casas)
- 10:15-10:45. Resultados de aplicación de brasinoesteroides en fases de enraizamiento y adaptación. (Dr. Ricardo Acevedo)
- 10:45-11:00. Receso (Coffee break)
- 11:00-11:30. Expresión diferencial de genes R en la interacción vitroplantas de caña de azúcar y moléculas esteroidales (Dra. YaquelinPuchades)
- 11:30-12:00. Cambios histológicos inducidos por moléculas esteroidales en vitroplantas de caña de azúcar. (Dra. Marta Arias)
- 12:00-12:30. Escalado de moléculas esteroidales en la biofabrica de caña de azúcar del INICA.(Dra. Aydiloide Bernal)
- 12:30-14:00 Almuerz0
- 14:00-16.00. Conclusiones e integración de resultados obtenidos en el Proyecto. Posibles trabajos a presentar en eventos y publicaciones. Futuras colaboraciones entre INICA (Cuba) y UNT, UNCA y CREAS. (Todos los miembros del proyecto y la Directora de Negocios y Colaboración del INICA, MSc. Yumarys Zambrano)



INFORME ADMINISTRATIVO CONTABLE

1. Resumen de la situación financiera.

Del presupuesto recibido que fueron 20 000 USD, se ejecutaron 19009.92 USD lo que constituye el 95 % de lo planificado.

Firma Director proyecto

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'R. Acevedo Rojas', written in a cursive style.

Nombre: Ricardo Acevedo Rojas

Fecha: 21 de junio de 2021