



ARTÍCULO CIENTÍFICO
CUBA & CAÑA

URL: <http://www.cuba-cane.inica.azcuba.cu> E-mail: journal.cuba.cane@gmail.com



PESQUISAJE DE *GLUCONACETOBACTER DIAZOTROPHICUS* EN LA SEMILLA
BOTÁNICA DE CAÑA DE AZÚCAR
OCCURRENCE OF *GLUCONATECOBACTER DIAZOTROPHICUS* IN THE
BOTANICAL SEED OF SUGARCANE

MARIO ALBERTO CASAS-GONZÁLEZ*, YAIMY BLANCO-MACHADO, JUANA DE LAS MERCEDES PÉREZ-PÉREZ,
VICTOR CARABALLOSO-TORRECILLA, RAFAEL VILLEGAS-DELGADO, MARIA LA O-HECHAVARRÍA

Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), Boyeros, La Habana, Cuba.

*Autor para correspondencia: Mario Alberto Casas-González, e-mail: mario.casas@inica.azcuba.cu

Palabras clave: RESUMEN

bacterias benéficas *Saccharum* spp. semilla original La bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* es una endófito natural de varios cultivos, entre ellos la caña de azúcar, la cual fue descubierta y aislada en Brasil en la década de los 80 del pasado siglo a partir de raíz, tallo y hojas. Por su carácter de endófito beneficioso (fijador de nitrógeno, productor de hormonas de crecimiento, solubilización de fósforo y potencial control biológico) ha sido arduamente estudiada. Debido a su carácter sistémico, en este trabajo se consideró la posible ocurrencia natural de la bacteria en la semilla botánica. Con este objetivo se extrajeron los ácidos nucleicos totales de semillas procedentes de 14 cruces del Centro Nacional de Hibridación de Sancti Spiritus. Se comprobó la calidad del ADN extraído y se sometió a amplificación por PCR (siglas en inglés) del gen 23S ARNr mediante cebadores específicos. No se obtuvieron bandas de amplificación del segmento de ADN deseado, lo que indicó la ausencia de la bacteria en las muestras de semillas estudiadas.

Keywords: ABSTRACT

Beneficial Bacteria *Saccharum* spp. Original Seed *Gluconacetobacter diazotrophicus* is a natural endophyte of several crops, among them sugarcane, from which it was discovered in Brazil in the decade of 1980, isolated from roots, stems and leaves. Because of its beneficial characteristics: nitrogen fixing, phytohormones producer, phosphorus solubilization and potential biological control, has been deeply investigated. Regarding its systemic character, this work considered its possible natural occurrence in the botanical seed of sugarcane. To accomplish this, total nucleic acids were extracted from seeds obtained from 14 crosses supplied by the National Hybridization Center of Sancti Spiritus. DNA from the total nucleic acids extracted was submitted to 23S rRNA gene PCR amplification by means of specific primers. The expected amplified DNA bands were not obtained indicating the absence of this bacterium in the samples analyzed.

INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar es la mayor fuente de azúcar en el mundo, actualmente es un cultivo híbrido como resultado de cruces entre seis diferentes especies del género *Saccharum*. La semilla botánica se produce como resultado de la polinización de las flores de caña de azúcar, es muy pequeña, menos de 1 mm de largo y se forma en las inflorescencias plumosas en los extremos de los tallos. Cada semilla tiene una cubierta de pelillos sedosos que permiten

atrapar el aire para permitir su dispersión. Las especies parentales de esta planta producen abundantes semillas pero muchos cultivares son mayormente estériles y éstas no se utilizan en el establecimiento de plantaciones comerciales ya que no producen individuos iguales a sus padres, en su lugar, son utilizadas en el proceso de hibridación para la búsqueda de genotipos sobresalientes que se adapten satisfactoriamente a los diversos ambientes productivos, mediante la identificación y aplicación de nuevas y mejores combinaciones híbridas, lo que constituye la parte esencial de

Recibido: 23 de mayo de 2020

Aceptado: 18 de diciembre de 2020

Este artículo se encuentra bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution License CCBY-NC (4.0) internacional. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



la labor de mejora genética de la caña de azúcar (Chaves-Solera, 2016).

Existen pocos estudios sobre microbiota acompañante de la semilla botánica de caña de azúcar, informándose una gran cantidad de patógenos que afectan la germinación y desarrollo de las posturas, constituyendo causa de problemas en el proceso de mejoramiento genético según Hernández-Medina & Heredia (1997), sin embargo, no existen informes sobre endófitos beneficiosos asociados a esta semilla.

En el caso de los cultivos no leguminosos como la caña de azúcar, los estudios sobre endófitos fijadores de dinitrógeno atmosférico han tomado un gran impulso principalmente sobre la base de las potencialidades de bacterias como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, la cual, debido a sus características ha sido ampliamente estudiada hasta llegarse a la secuenciación total de su genoma según Hearlache *et al.* (2000) y constituir un microorganismo base de diferentes productos biofertilizantes desarrollados a nivel mundial y en Cuba como el bioproducto+ el ICIBIOP-GLU, fruto de la colaboración estas investigaciones entre el INICA y el ICIDCA (González *et al.*, 2020). La confirmación de esta hipótesis coadyuvaría a un mejor desarrollo de las posturas que se incorporan al largo proceso de obtención de futuras variedades comerciales (INICA, 2011).

El objetivo de este trabajo, por tanto, se centró en detectar la presencia natural de esta bacteria benéfica en la semilla botánica, aspecto sobre el cual no existen trabajos previos publicados a nivel mundial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron muestras de semilla botánica procedentes de 14 cruces obtenidos en el Centro Nacional de Hibridación de Sancti Spiritus que se relacionan a continuación (Tabla 1).

Las muestras previamente conservadas en refrigeración a 4°Celsius, fueron minuciosamente despojadas de las pelusas acompañantes y de las minúsculas semillas se tomaron 500 mg de cada cruce, colocándose las mismas en tubos estériles de 1.5 mL con tres balines de vidrio para maceración en equipo Fast-Prep (MP Biomedicals LLC, Santa Ana, Ca. USA) a 8000 rpm durante 2 minutos. Posteriormente se extrajeron los de ácidos nucleicos totales mediante el protocolo del (Aljanabi *et al.*, 1999). La calidad fue comprobada mediante electroforesis en gel de agarosa a 2%, lo cual permitió realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por su sigla en inglés) con el objetivo de detectar la posible presencia de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en las muestras por amplificación del gen 23S ADN_r de esta especie utilizando los cebadores específicos G1 (5'-GTTGGCTTAGAAGCA

Tabla 1. Cruces utilizados para la obtención de semilla botánica

	Cruce	Hembra	Macho
1	619	C90-501	Ja60-5
2	1194	C93-540	C87-253
3	1277	B6368	C120-78
4	1301	COO-216	B6368
5	1342	C90-501	CP56-59
6	1383	CP70-1133	C87-253
7	1222	LTMex96-10	C97-373
8	1351	CP65-392	C88-553
9	479	CP65-392	C237-80
10	527	C86-251	Ja64-19
11	554	C86-251	C87-51
12	616	C92-524	Mex60-1459
13	620	C90-501	C93-540
14	986	DB66/113	C187-68

GCC-3' y G2 (5'-TGCGGCAAAAGCCGGAT-3) Kirchof *et al.* (1998), que producen una banda característica de 491 pb. La mezcla de reacción para volumen final de 12 µL se conformó de la siguiente forma: ADN-0,5 µL; G1-0.25 µL; G2-0.25 µL; Master fix -2.00 µL y agua MilliQ-9.00 µL. La PCR se llevó a cabo en un termociclador BOECO, TC-PRO (Hamburgo, Alemania), utilizando el programa: 94°C-3 min; (94°C-0.30 min, 56°C-0.30 min, 70°C-1 min) 40 ciclos; 72°C-5 min y 4°C. Las bandas obtenidas se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% en un transiluminador ultravioleta (Vilmer Lourmad, Francia) y se utilizó el marcador de peso molecular (Ladder 100 pb Promega).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se lograron ácidos nucleicos de calidad como se observa en la (Fig. 1) a excepción de la muestra 2, que debió confrontar algún problema en la mezcla de reacción.

La Figura 2 muestra los resultados negativos de la PCR para la amplificación del gen 23S ARN_r específico de *G. diazotrophicus*, al no observarse en ninguna de las muestras la banda de 491 pb esperada como si se observan para los controles positivos empleados, confirmándose la ausencia del endófito en la semilla de los 14 cruces estudiados.

Los pocos estudios publicados sobre microbiota asociada a la semilla botánica de caña de azúcar han informado patógenos fúngicos de los géneros: *Drechalera*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Phoma*, *Nigrospora* y *Epicoccum*, con los mayores porcentajes de afectación causados por

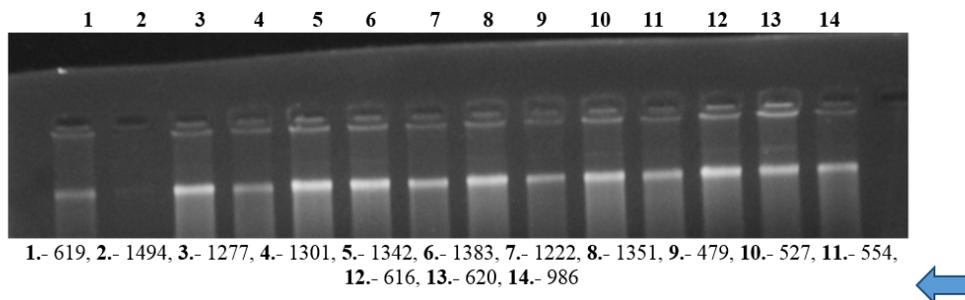


Figura 1. Gel de agarosa al 2% donde se aprecia la calidad del ADN extraído de la semilla botánica obtenida de los 14 cruces estudiados. El corte de la foto no incluyó el ARN.

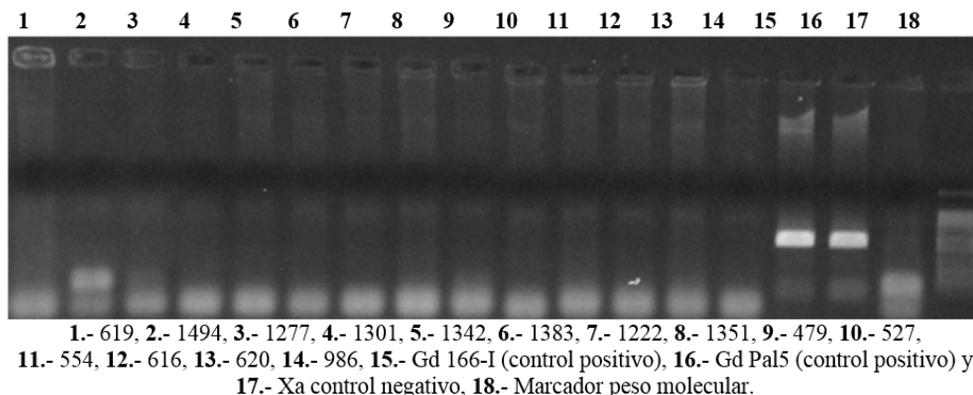


Figura 2. Gel de agarosa al 2% mostrando los resultados negativos de la amplificación por PCR del gen 23S ARNr de *G. diazotrophicus* en las muestras de ADN de semilla botánica analizadas.

Fusarium semitectum, *Alternaria tenuissima* y *Alternaria longissima* según Hernández-Medina & Heredia (1997), pero no existen hasta el momento informes sobre bacterias benéficas asociadas a esta semilla o intentos, como en el caso que nos ocupa, de detectarlas.

G. diazotrophicus además de su capacidad de fijar dinitrógeno atmosférico suma las siguientes características: producción de fitohormonas auxinas y giberelinas según Fuentes-Ramírez et al. (1999); Jiménez-Salgado et al. (1994); capacidad de solubilización de zinc y fósforo, micro y macronutrientes respectivamente, de crucial importancia en el crecimiento, desarrollo y rendimiento de muchas plantas según Saravanan et al. (2007a); antagonista de importantes patógenos de la caña de azúcar como *Xanthomonas albilineans* y *Colletotrichum falcatum*, agentes causales de la escaldadura foliar y pudrición roja respectivamente (Arecibia et al., 2006; Muthukumarasamy et al., 2000; Piñón et al., 2002). Otros informes han demostrado además su acción indirecta contra el nemátodo *Meloidogyne incognita* (Saravanan, et al. (2007b) y algunas especies del hongo *Fusarium* sp (AP & PP, 2011), aspectos que convierten a esta bacteria en un microorganismo multifecto.

Los sitios de colonización de *G. diazotrophicus* y su distribución en el interior de la caña de azúcar aún no se han esclarecido totalmente. Se ha demostrado que coloniza los espacios intercelulares de la raíz y los vasos del xilema (Fuentes-Ramírez et al., 1999). Otros estudios señalan que se localiza en espacios intercelulares del tallo correspondientes al apoplasto de plantas adultas (Dong et al., 1994). La dispersión en el interior del cultivo ha sido también motivo de discrepancia. Algunos trabajos sugieren que *G. diazotrophicus* se dispersa en los tejidos internos a través de los vasos del xilema según Hernández & Heredia (1997) y en otros se objeta que ésta sea la vía de dispersión, argumentando que existen barreras morfológicas que impiden la comunicación del xilema de un entrenudo a otro (Dong et al., 1994). Al respecto, Dong et al. (1997) observaron que, en condiciones de transporte activo, las bacterias penetran al xilema y son transportadas a través de éste, aunque se determinó que la acumulación de ellas en los entrenudos provoca la no funcionalidad de la estructura. Otros estudios plantean que prefiere los espacios intercelulares y tejidos vasculares como el xilema Dong et al. (1997). Ortega & Rodés (1994) por su parte, encontraron las mayores poblaciones en la zona apical de los tallos.

CONCLUSIONES

La hipótesis planteada sobre la posible ocurrencia natural de *G. diazotrophicus* en la semilla botánica, tomando en consideración el presunto carácter sistémico de este microorganismo en la caña de azúcar, no ha sido demostrada en las muestras a estudiadas.

RECOMENDACIONES

Un estudio a partir de una muestra más amplia y representativa de cruces cuyos progenitores hayan sido confirmados previamente colonizados por el endófito, permitirá llegar a resultados más concluyentes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aljanabi, S. M., Forget, L., & Dookun, A. (1999). An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide-and polyphenol-free sugarcane DNA. *Plant Molecular Biology Reporter*, 17(3), 281-282.
- Arencibia, A. D., Estevez, Y., Vinagre, F., Bernal, A., Perez, J., Carmona, E., Hemerly, A. S., & Santana, I. (2006). Induced-resistance in sugarcane against pathogenic bacteria *Xanthomonas albilineans* mediated by an endophytic interaction. *Int Soc Sugarcane Tech*, 8(4), 272-280.
- Chaves-Solera, M. A. (2016). *La mejora genética de la caña de azúcar en Costa Rica*. 28, Costa Rica.
- Dong, Z., Canny, M. J., McCully, M. E., Roboredo, M. R., Fernández, C. C., Ortega, E., & Rodés, R. (1994). A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. A new role for the apoplast. *Plant Physiology*, 105, 1139-1147.
- Dong, Z., McCully, M. E., & Canny, M. (1997). Does *Acetobacter diazotrophicus* Live and Move in the Xylem of Sugarcane Stems? Anatomical and Physiological Data. *Annals of Botany*, 80(2), 147-158.
- Fuentes-Ramírez, L. E., Caballero-Mellado, J., Sepúlveda, J., & Martínez-Romero, E. (1999). Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. *FEMS Microbiology Ecology*, 29(2), 117-128.
- González, M., De León, M. E., Rodríguez, M., & Noy, A. (2020). *Tecnologías y buenas prácticas para el manejo de los cultivos*. Manual publicado por el INICA, La Habana, Cuba.
- Mario Alberto Casas-González, Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Carretera a CUJAE, km. 1½, Boyeros, La Habana, Cuba, C.P. 19390, e-mail: mario.casas@inica.azcuba.cu
- Yaimy Blanco-Machado, Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Carretera a CUJAE, km. 1½, Boyeros, La Habana, Cuba, C.P. 19390, e-mail: mario.casas@inica.azcuba.cu
- Juana de las Mercedes Pérez-Pérez, Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Carretera a CUJAE, km. 1½, Boyeros, La Habana, Cuba, C.P. 19390, e-mail: mario.casas@inica.azcuba.cu
- Hearlache, T. C., Kent, A. D., Riggs, P., Iñiguez, A., Chelius, M. K., & Triplett, E. W. (2000). *The Gluconacetobacter diazotrophicus genome project*. 82.
- Hernández-Medina, C., & Heredia, I. (1997). Microflora asociada a la semilla botánica de caña de azúcar en 9 combinaciones de la campaña de hibridación de 1992-1993. *AgroEnfoque*, 88, 58.
- INICA. (2011). *Manual de Normas y Procedimientos del Programa de Fitomejoramiento de la Caña de Azúcar en Cuba, capítulo 5* [Manual de Normas y Procedimientos]. Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), La Habana, Cuba.
- Jiménez-Salgado, T., Aparicio, R., & Caballero-Mellado, J. (1994). *Detección de citocinas en Acetobacter diazotrophicus aislado de caña de azúcar*. Reunión Latinoamericana de Rhizobiología, La Habana, Cuba.
- Kirchhof, G., Baldani, J. I., Reis, V. M., & Hartmann, A. (1998). Molecular assay to identify *Acetobacter diazotrophicus* and detect its occurrence in plant tissues. *Canadian Journal of Microbiology*, 44(1), 12-19.
- Muthukumarasamy, R., Rebathi, G., & Vadivelu, M. (2000). Antagonic potential of N₂-fixing *Acetobacter diazotrophicus* against *Colletotrichum falcatum* Went, a casual of red-rot of sugar. *Current Science*, 78, 1063-1065.
- Ortega, E., & Rodés, R. A. (1994). Nitrogen fixing endophyte of sugarcane stems. *Plant Physiol.*, 105, 1139-1147.
- Piñón, D., Casas, M., Blanch, M., Fontaniella, B., Blanco, Y., Vicente, C., Solas, M. T., & De León, M. E. (2002). *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugar cane endosymbiont, produces a bacteriocin against *Xanthomonas albilineans*, a sugar cane pathogen. *Research in Microbiology*, 153(6), 345-351.
- Saravanan, V. S., Kalaiarasan, P., Madhaiyan, M., & Thangaraju, M. (2007). Solubilization of insoluble zinc compounds by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and the detrimental action of zinc ion (Zn²⁺) and zinc chelates on root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Letters in applied microbiology*, 44(3), 235-241.
- Saravanan, V. S., Osborne, J., Madhaiyan, M., Mathew, L., Chung, J. B., Ahn, K. S., & Sa, T. M. (2007). Zinc metal solubilization by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and induction of pleomorphic cells. *Journal of microbiology and biotechnology*, 17(9), 1477-1482.

Victor Carabaloso Torrecilla, Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Carretera a CUJAE, km. 1½, Boyeros, La Habana, Cuba, C.P. 19390, e-mail: mario.casas@inica.azcuba.cu

Rafael Villegas Delgado, Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Carretera a CUJAE, km. 1½, Boyeros, La Habana, Cuba, C.P. 19390, e-mail: mario.casas@inica.azcuba.cu

Maria La O-Hechavarría, Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Carretera a CUJAE, km. 1½, Boyeros, La Habana, Cuba, C.P. 19390, e-mail: mario.casas@inica.azcuba.cu

Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.

La mención de marcas comerciales de equipos, instrumentos o materiales específicos obedece a propósitos de identificación, no existiendo ningún compromiso promocional con relación a los mismos, ni por los autores ni por el editor.