



AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LA CAÑA DE AZÚCAR (*SACCHARUM OFFICINARUM*) VARIEDAD CP 722086

ISOLATION AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS ASSOCIATED WITH SUGARCANE (*SACCHARUM OFFICINARUM*) CP 722086 VARIETY

C.L. Vanegas Vanegas¹, J.A. Gómez Rodríguez¹

¹ Universidad Nacional de Ingeniería. Programa Institucional Agropecuario y Agroindustrial,
Vicerrectoría General. Managua, Nicaragua.

² Nombre de la institución. Facultad, división, programa o área. Ciudad, País.

*leoncio.vanegas@gmail.com

(recibido/received: 05-02-2018; aceptado/accepted: 31-07-2018)

RESUMEN

El cultivo de la caña de azúcar contribuye a la economía nicaragüense generando el 6.9% del PIB nacional en 2016. Actualmente, está en riesgo el crecimiento de la industria azucarera y su transformación en una biofabrica, tanto por las malas prácticas agrícolas (uso excesivo de agroquímicos y degradación del suelo) como por los efectos del cambio climático, que van desde sequías hasta enfermedades y plagas emergentes. Una de las alternativas más prometedoras para enfrentar la problemática, es el conocimiento de los microorganismos nativos asociados a los principales cultivos (patógenos y benéficos) y poder tomar decisiones de manejo acertadas. En este trabajo, aislamos éstos microorganismos, los identificamos a nivel de ADN y obtuvimos información de su función y relación con el cultivo, constituyendo una base de datos biológica que en adelante será utilizada para el desarrollo de productos biológicos y las mejores estrategias de control para los patógenos emergentes. Esta pionera investigación desarrollada en Nicaragua, enfocada en la microbiota asociada al cultivo de la caña de azúcar, contribuye a la comprensión de la relación planta-suelo. Y los resultados aportan a la innovación agrícola, la mitigación de los efectos del cambio climático y la sostenibilidad ambiental.

Palabras claves: Caña; Microorganismos; Biotecnología; Sostenibilidad; Cambio climático.

ABSTRACT

The cultivation of sugar cane contributes to the Nicaraguan economy generating 6.9% of the national GDP in 2016. Currently, it is at risk the growth of the sugar industry and its transformation into a bio factory, both by poor agricultural practices (excessive use of agrochemicals and soil degradation) as by the effects of climate change, ranging from droughts to emerging diseases and pests. One of the most promising alternatives for dealing with the problem is the knowledge of the native microorganisms (pathogens and beneficial) associated with the main crops and be able to make sound management decisions. In this work,

we isolate these microorganisms, we identified them at the DNA level and obtained information of its role and relationship with the culture, constituting a biological database that will be used for the development of biological products and improved control strategies for emerging pathogens. This pioneering research developed in Nicaragua, focused on the microbiotic associated to the cultivation of sugarcane and contributes to the understanding of the plant-soil system relationship. These results are inputs to agricultural innovation, mitigation of the effects of climate change and environmental sustainability.

Keywords: Sugarcane; Microorganisms; Biotechnology; Sustainability; Climate change.

1. INTRODUCCIÓN

En Nicaragua el cultivo de la caña de azúcar es un rubro de gran importancia por su contribución al PIB que es del 6.9%, (PIB Trimestral Julio, 2016) y sigue expandiéndose debido a la rentabilidad que este brinda a medianos y grandes productores. Se espera un mayor crecimiento de la industria azucarera a nivel mundial y hay mucho interés en su transformación en una biofábrica por su dinámica productiva, ya que posee varios sub productos, entre ellos la producción de energía eléctrica derivada de la combustión del bagazo, alcohol de diferentes grados como carburantes o farmacéuticos. (NETAFIN, 2001)

Las zonas productoras del cultivo de caña de azúcar de nuestro país son los departamentos de León, Chinandega, Rivas y Managua. La zona de San Rafael del Sur, enclave del ingenio Montelimar representa un 5.39 % de la producción nacional de azúcar, pero se ha visto afectada en el periodo del 2012-2015 por la sequía y enfermedades emergentes provocadas por patógenos, ambos considerados efectos negativos del cambio climático. Otra de las grandes amenazas para el incremento de la producción y la sostenibilidad, es el uso excesivo de agroquímicos utilizados en la fertilización, la prevención, control de enfermedades y vectores. Sin embargo estas prácticas han provocado alteraciones al equilibrio agroecológico y aumentado los costos de producción anual, (IV Censo Nacional Agropecuario, 2012)

En las investigaciones realizadas por CENICAÑA en Colombia, se han identificado diferentes afecciones asociadas con las etapas del ciclo vegetativo de la planta. Las principales enfermedades que afectan este cultivo son producidas por hongos, bacterias, virus y nemátodos, por lo que es crucial conocer los microorganismos asociados al cultivo, predominantes en cada zona productiva (Cenicana, 2013)

El presente trabajo de investigación consistió en el aislamiento de los microorganismos asociados a la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), con el fin de indagar la fauna de los microorganismos procedente de plantas y suelo de las áreas cultivadas a escala comercial del Ingenio Montelimar; de esta forma se cuenta con información de los tipos de microorganismos (bacterias, hongos y levaduras), asociados al cultivo en esta zona específica y con la utilización de técnicas de biología molecular se determinó su identidad a nivel de especie y permitió conocer su relación y función biológica con la planta ya sea esta benéfica o patogénica a través de información contenida en bases de datos bioinformáticas.

Como resultado, se logró establecer una base de datos de 167 microorganismos, 16 de los cuales fueron seleccionados e identificados a nivel molecular (13 hongos y 3 bacterias), de los cuales 10 con posible función patogénica y 6 benéfica.

Este es el primer trabajo de investigación realizado en Nicaragua orientado al estudio de la microbiota asociada al cultivo de la caña de azúcar, generando insumos para la implementación de técnicas de innovación agrícola en la que el uso de microorganismos será fundamental para la mitigación de los efectos del cambio climático y la sostenibilidad ambiental.

2. DESARROLLO

EL trabajo de campo fue realizando en el Ingenio Montelimar, ubicado en el municipio de San Rafael del Sur, departamento de Managua, Nicaragua, en septiembre del año 2015

2.1 Muestreo de suelo, plantas enfermas y sanas de caña de azúcar

Para la toma de muestras se seleccionó las áreas de cultivo de soca 1 o primer rebrote (5 meses). Con el apoyo técnico de la corporación Montelimar, visitamos el área afectada con síntomas de secado en las hojas, se recolectaron la porción del tercio superior de la hoja TVD y se colocó en una bolsa plástica ziplock eligimos al azar plantas sanas y plantas afectadas por síntomas evidentes de enfermedad (coloración de las hojas, daños foliares, tamaño) y de igual manera seleccionamos trozos de tallo, 200 g de tierra circundante y raíces de la planta. Todo el material, fue colocado por separado en bolsa ziplock y trasladado al laboratorio para su preparación.

2.2 Tratamiento y siembra de muestras en el laboratorio

Las muestras fueron preparadas en el Laboratorio de Alimentos de la Facultad de Química (FIQ – UNI) y de acuerdo a los síntomas observados se tomaron 5 sub muestras de tejido vegetal tanto del área foliar como de los tallos y raíces. Como se aprecia en la figura 1, se cortaron pequeñas secciones de 1cm² y se lavaron con agua destilada estéril y cloro al 1% y alcohol al 70%. Las sub muestras, se dejaron secar a temperatura ambiente y luego se sembraron directamente en el medio de cultivo sólido Sabouraud para hongos y agar nutritivo para bacterias.

Para las muestras de suelo se usó la técnica de dilución seriada. Se tomó 1 gramo de suelo que se diluyo en 10 mL de agua estéril o solución salina al 1% y se prepararon 7 tubos con 9 mL de agua estéril. De la solución madre se tomó 1mL y se transfirió al tubo de 10-1 y así sucesivamente hasta alcanzar 10⁻⁷, las tres últimas diluciones fueron sembradas en platos Petri, con medio de cultivo sólido Sabouraud o agar nutritivo, transfiriendo 100 uL de cada dilución y luego expandiendo usando el asa de Digralski. Los platos fueron incubados a 30°C en una incubadora, por 10 días haciendo chequeos diarios

2.3 Preparación de medios de cultivo Siembra

Todos los medios de cultivo usados son comerciales, la preparación consistió en la suspensión del polvo de acuerdo al volumen a preparar, calentamiento en cocina para diluir y luego esterilización en autoclave por 15 minutos a 121°C.

3.4 Siembra, purificación e identificación de microorganismos

La siembra de microorganismos se realizó por la técnica de cultivo en placa, para luego proceder a la purificación de microorganismos de interés tomándolos con un asa de siembra estéril y sembrándolos en un plato petri con cultivo por la técnica de agotamiento, hasta tener colonias individuales aisladas. Una vez confirmada la pureza del microorganismo, se sembró en una nueva placa para observar su morfología y el estudio microscópico.

La identificación morfológica se realizó haciendo observaciones visuales del tipo de colonia, tamaño, velocidad de crecimiento, color, textura, presencia de esporas y coloración del medio de cultivo. Luego, se procedió a la observación microscópica y se realizaron las tinciones microbiológicas de Gram para bacterias y azul de lactofenol para hongos.

La siembra de microorganismos se realizó por la técnica de cultivo en placa, para luego proceder a la purificación de microorganismos de interés tomándolos con un asa de siembra estéril y sembrándolos en un plato petri con cultivo por la técnica de agotamiento, hasta tener colonias individuales aisladas. Una vez confirmada la pureza del microorganismo, se sembró en una nueva placa para observar su morfología y el estudio microscópico.

2.5 Identificación molecular de cepas seleccionadas

La identificación molecular de los microorganismos se realizó en el Centro de Biología Molecular de la UCA. Para esto se hizo la extracción de ADN genómico del patógeno utilizando un kit comercial (PROMEGA), seguidamente la amplificación de una región del ARN ribosomal de la región 16S y 18S (para bacterias y hongos respectivamente) para lo cual se utilizan cebadores específicos. Luego, se chequeó el producto amplificado a través de geles de agarosa y un transiluminador de rayos UV. A continuación ese fragmento amplificado es purificado y amplificado nuevamente con cebadores marcados con fluorescencia y secuenciados por el método de Sanger, los cuales fueron detectados en un equipo de secuenciación ABI3130 (Applied Biosystems). Una vez obtenida la secuencia, se sometió a la base de datos bioinformática del NCBI (National Center for Biotechnology Information) usando la herramienta BLAST-N, con la que se obtiene, de acuerdo al porcentaje de similitud, las cepas más relacionadas a la cepa en cuestión.

3. RESULTADOS

3.1 Tipos y cantidad de microorganismos aislados en los diferentes tejidos de la caña de azúcar.

El objetivo principal del presente estudio, fue conocer la biodiversidad microbiana asociada al cultivo de caña de azúcar. Varios estudios se han centrado en los microorganismos causantes de enfermedades con síntomas visibles o reconocibles, a diferencia de nuestro abordaje, en el que aislamos tanto patógenos como benéficos, que se presentan en mayor frecuencia. Las técnicas de microbiología básica permiten obtener un aproximado del 1% de la biodiversidad microbiana presente debido a la limitante del medio de cultivo, espacio del plato de Petri y diferentes factores de crecimiento que no permiten que muchos microorganismos germinen y se desarrollen en las condiciones de laboratorio (Madigan et. al.,2004). De esta manera, se logró aislar 167 microorganismos de las diferentes matrices utilizadas: hojas, tallos, raíces y suelo circundante de la raíz o rizosfera. En la siguiente Tabla 1, se presentan los datos de los microorganismos aislados de acuerdo a la matriz.

Tabla 1: Número de microorganismos aislados de partes vegetales y suelo cultivado con caña de azúcar.

| Matriz | Bacterias | Hongos | Levaduriformes | Total |
|--------------|-----------|-----------|----------------|------------|
| Hojas | 5 | 9 | 3 | 17 |
| Tallos | 10 | 3 | 5 | 18 |
| Raíces | 24 | 15 | 13 | 52 |
| Suelo | 40 | 25 | 15 | 80 |
| Total | 79 | 52 | 36 | 167 |

De la Tabla 1, se puede notar que los microorganismos más abundantes fueron las bacterias, seguido de los hongos y por último las levaduras, lo cual concuerda con lo reportado por de Souza et.al. (2016). Morfológicamente las diferencias más marcadas entre tipos de colonias se observó en los hongos, por su esporulación y color de la colonia. Las bacterias aunque más abundantes, se diferenciaban poco por el tipo de colonia y las levaduriformes eran prácticamente colonias idénticas

3.2 Selección e identificación molecular de los microorganismos más frecuentes.

De los 167 microorganismos aislados, se seleccionaron 13 cepas de hongos y 3 cepas de bacterias para su identificación molecular. La selección se basó en la frecuencia con la que la colonia se repitió en los platos Petri con medio de cultivo, asumiendo que eran éstos los que colonizaban la planta en mayor número. Se identificaron un total de 16 microorganismos. La metodología utilizada fue la secuenciación de Sanger, que es la estándar cuando se trabaja en combinación con las técnicas básicas de microbiología. En la figura 2, se puede observar el tipo de microorganismo y su identificación molecular. La identificación molecular se realizó siguiendo el protocolo recomendado por el NCBI (National Center for Biotechnology Information) de Estados Unidos. Para esto, luego de obtenida la secuencia, ésta es editada usando el programa bioinformático BIOEDIT, con el que se puede eliminar o definir bases de ADN erróneas o dudosas hasta obtener una secuencia más limpia. A continuación, accedimos al sitio web de la base de datos de nucleótidos del NCBI (Nucleotide database) y se procedió a realizar el análisis (Altschul et. al., 1990). Este análisis consiste en alinear la secuencia en cuestión, con una base de datos de secuencias y se compara la similitud entre todas, encontrando las más similares, lo cual se muestran en las Tabla 2.

Tabla 2. Identificación molecular de microorganismos asociados a la caña de azúcar.

| Nº | Código | Microorganismo | Marcador ADN | Identificación molecular |
|----|----------|----------------|---------------|-----------------------------------|
| 1 | 1-P1 | Hongo | 18S-ITS1/ITS4 | <i>Fusarium fujikuroi</i> |
| 2 | 2-P2 | Hongo | 18S-ITS1/ITS4 | <i>Aspergillus tamaraii</i> |
| 3 | 3-P3 | Hongo | 18S-ITS1/ITS4 | <i>Paecilomyces variotii</i> |
| 4 | 4-P4 | Hongo | 18S-ITS1/ITS4 | <i>Aspergillus terreus</i> |
| 5 | 5-P5 | Hongo | 18S-ITS1/ITS4 | <i>Aspergillus terreus</i> |
| 6 | 6-P6 | Hongo | 18S-ITS1/ITS4 | <i>Penicillium citrinum</i> |
| 7 | 7-P7 | Hongo | 18S-ITS1/ITS4 | <i>Penicillium citrinum</i> |
| 8 | 8-P8 | Hongo | 18S-ITS1/ITS4 | <i>Aspergillus alahabadii</i> |
| 9 | 9-P9 | Hongo | 18S-ITS1/ITS4 | <i>Aspergillus tamaraii</i> |
| 10 | 10-P10 | Hongo | 18S-ITS1/ITS4 | <i>Aspergillus niger</i> |
| 11 | 11-P7R31 | Hongo | 18S-ITS1/ITS4 | <i>Paecilomyces formosus</i> |
| 12 | 12-P7R32 | Hongo | 18S-ITS1/ITS4 | <i>Curvularia aerea</i> |
| 13 | 13-P7R33 | Hongo | 18S-ITS1/ITS4 | <i>Curvularia lunata</i> |
| 14 | 14-BXAM | Bacteria | 16S-FD1/RP1 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> |
| 15 | 15-BXBL | Bacteria | 16S-FD1/RP1 | <i>Burkholderia gladioli</i> |
| 16 | 16-BAMY | Bacteria | 16S-FD1/RP1 | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> |

Análisis de la secuencia para identificación del hongo *Fusarium fujikuroi*.

>1P-1 Secuencia correspondiente a la muestra 1 de hongos

```
AAAGGTGGGTTGGGGTTTCGGGTGAACTCCCAACCCTGAGGACAAACCATAGTTGCCTCGGA
AGATCAGCCCGCTCCCGGTAACGCGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCAAACTCTGTTTCTA
TATGTAACCTTCTGAGTAAACCATAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCT
GGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT
CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT
CATTTCAACCCTCAAGCCCAGCTTGGTGTGTTGGGACTCGCGAGTCAAATCGCGTTCCCCAAAT
GATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCTCGTTACTGGTAATCGTC
GCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGC
TGAACCTTAAGCATATCAATAAGGCGGAGGAA
```

Análisis de alineamiento con la herramienta Blast-N del NCBI. Abajo, un acercamiento de esta imagen.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|-------|----------------------------|
| <input type="checkbox"/> Fusarium sp. PSTF6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence | 883 | 883 | 95% | 0.0 | 98% | KM053238.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium verticillioides isolate ZS102 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence | 881 | 881 | 95% | 0.0 | 98% | KJ598856.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium sp. FsSITNAU8W-R3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence | 880 | 880 | 95% | 0.0 | 98% | KJ434051.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium sp. Fs032TNW-T internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene | 880 | 880 | 95% | 0.0 | 98% | KF293323.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium fujikuroi isolate GX28 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence | 880 | 880 | 95% | 0.0 | 98% | KJ000434.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium fujikuroi isolate FZ04 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence | 880 | 880 | 95% | 0.0 | 98% | KJ000432.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium subglutinans genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence, strain: MAFF 235376 | 880 | 880 | 95% | 0.0 | 98% | AB587009.1 |
| <input type="checkbox"/> Gibberella moniliformis strain RKSDPK-01 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence | 880 | 880 | 96% | 0.0 | 98% | GU055307.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium sacchari strain NRRL 43543 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence | 880 | 880 | 95% | 0.0 | 98% | EF453121.1 |
| <input type="checkbox"/> Fungal sp. SK11 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene | 878 | 878 | 95% | 0.0 | 98% | KP893212.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium sp. FsSITNAU8W-T2 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene | 878 | 878 | 95% | 0.0 | 98% | KJ434048.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium sp. FsSITNAU8W-T1 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene | 878 | 878 | 95% | 0.0 | 98% | KJ434047.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium sacchari isolate FsSITNAU8W-T 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence | 878 | 878 | 95% | 0.0 | 98% | KJ434046.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium sp. Fs027TNW-T2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence | 878 | 878 | 95% | 0.0 | 98% | KF293374.1 |
| <input type="checkbox"/> Fusarium sp. Fsc671TNPB1-TR-So 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence | 878 | 878 | 95% | 0.0 | 98% | KF293349.1 |

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

| |
|---|
| <input type="checkbox"/> Fusarium sp. PSTF6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence |
| <input type="checkbox"/> Fusarium verticillioides isolate ZS102 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence |
| <input type="checkbox"/> Fusarium sp. FsSITNAU8W-R3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence |
| <input type="checkbox"/> Fusarium sp. Fs032TNW-T internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene |
| <input type="checkbox"/> Fusarium fujikuroi isolate GX28 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence |
| <input type="checkbox"/> Fusarium fujikuroi isolate FZ04 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence |
| <input type="checkbox"/> Fusarium subglutinans genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence, strain: MAFF 235376 |
| <input type="checkbox"/> Gibberella moniliformis strain RKSDPK-01 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence |
| <input type="checkbox"/> Fusarium sacchari strain NRRL 43543 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence |
| <input type="checkbox"/> Fungal sp. SK11 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene |
| <input type="checkbox"/> Fusarium sp. FsSITNAU8W-T2 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene |
| <input type="checkbox"/> Fusarium sp. FsSITNAU8W-T1 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene |

La identificación molecular de los microorganismos seleccionados nos revela que hay una variedad de microorganismos asociados con el cultivo de la caña de azúcar. El hongo IP-1 *Fusarium* fue inoculado nuevamente en otro experimento llevado a cabo en el invernadero, provocando los síntomas característicos de la enfermedad conocida como cogollo retorcido Figura 1. Aunque sin provocar daños mayores al cultivo. De la Tabla 2. Se puede observar que se repitieron 3 tipos de hongos *Aspergillus terreus*, *Aspergillus tamaris* y *Penicillium citrinum*, lo que indica que aunque morfológicamente algunas cepas presenten diferencias (variación de color y esporulación) están relacionadas a nivel molecular posiblemente siendo variantes de especies y que para aclarar si hay diferencias genéticas serían necesarios el uso de más marcadores moleculares.



Figura 1. Síntoma provocado por *Fusarium fujikuroi*

3.3 Función o utilidad (patógenos o benéficos) de los microorganismos identificados

De acuerdo a la literatura revisada encontramos que los microorganismos identificados tienen diferentes funciones en el cultivo de la caña de azúcar y posiblemente en otras plantas.

***Fusarium fujikuroi*:** (*Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenweber, es causante de la enfermedad conocida como cogollo retorcido o Pokkah boeng de amplia distribución mundial en áreas cultivadoras de caña. Las esporas del hongo se diseminan principalmente con ayuda de corrientes de viento y agua, persiste de manera natural en residuos de plantas y suelo, y también puede infectar otras especies de plantas como sorgo, maíz, arroz, pastos y arvenses.

El cogollo retorcido afecta a la mayoría de variedades de caña de azúcar, entre ellas CP 57-603, PR 61-632, MZC 74-275, V 71-51, CC 84-75, CC 85-92, CC 93-4418, etc., en algunas con mayor severidad e incidencia que en otras, pero ésta no se considera una enfermedad de importancia económica para el cultivo. Por lo tanto, a pesar de realizarse observaciones y evaluaciones al respecto, no se requiere mejoramiento genético dirigido a obtener resistencia a esta enfermedad (Cenicaña, 2013).

***Aspergillus tamaritii*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus alahabadii* y *Aspergillus niger*:** aunque se considera que no son mayores causantes de enfermedad en las plantas, las especies de *Aspergillus* son responsables de varios desórdenes en varias especies de plantas y productos derivados. Las especies más comunes son *A.niger* y *A.flavus* y otros en menor escala. Ellos pueden contaminar productos en diferentes etapas, incluyendo pre y pos cosecha, procesamiento y manejo. Los cambios causados por el efecto de estas cepas pueden ser sensoriales, nutricionales y también cualitativos; pero la consecuencia más notable de su presencia son las micotoxinas. Las micotoxinas de mayor interés producidas por *Aspergillus* son las aflatoxinas y ocratoxinas, muchas de ellas son muy tóxicas y carcinogénicas (Perrone et al., 2007) Otras aplicaciones de mucha importancia de los *Aspergillus* es en la industria de los bioprocesos, siendo claves en el tratamiento de residuos sólidos vegetales por su alta capacidad de producir celulasas y xilanasas, también para producir ácido cítrico, lo cual tiene mucho sentido debido a que las especies que componen este amplio género de hongos son naturalmente encontrados en materiales en descomposición en el suelo.

***Paecilomyces variotii*, y *Paecilomyces formosus*:** las cepas pertenecientes a este género de hongos son mohos ambientales comunes que son ampliamente encontrados en compost, suelos y productos alimenticios. Uno de los datos más interesantes para aplicaciones biotecnológicas es que estos hongos son

entomopatógenos y podrían ser usados para el biocontrol de insectos que atacan cultivos y que dejan grandes pérdidas anuales. También, estas dos especies presentan la ventaja de poder crecer a altas temperaturas (70°C) y sobreviven hasta 20 minutos a en el rango de 80 a 90°C, por lo que pueden ser utilizados en procesos biotecnológicos que requieren estas temperaturas, pero también presentan un riesgo para la industria alimenticia porque su eliminación es tediosa aún luego de pasteurizar los productos. (Song et. al. 2016).

***Curvularia aeria* y *Curvularia lunata*:** el teleomorfo o estado sexual conocido como *Cochliobolus*. Son causantes de enfermedades en plantas en especial las monocotiledóneas como la caña de azúcar en la que causa el decaimiento de la semilla, provocando la falta de germinación y ya en plantas adultas una enfermedad conocida como hoja punteada, que es altamente infecciosa. También se reporta que causa alergias e infecciones respiratorias y dérmicas en humanos (Dean et. al.,2014).

En otro estudio realizado a nivel de invernadero se inoculó y provocó los síntomas de las manchas pardas en las hojas, lo muestra la Figura 2



Figura 2. Síntoma provocado por Curvularia

***Penicillium citrinum*,:** Las especies de este grupo, tienen distribución mundial y han sido aislados de varias fuentes, desde suelos hasta alimentos. Normalmente se encuentran en latitudes tropicales ya que no soportan bajas temperaturas. *P. citrinum* ha sido reportado como endófito de varias plantas y es el hongo más frecuente en tallos y raíces de las plantas de café, su posible función más importante es la producción de giberelinas que promueven el crecimiento (Houbraken et. al.2010).

***Pseudomonas fluorescens*:** Hay mucha investigación relacionada al género de bacterias Pseudomonas, debido a que pueden ser patógenos de gran importancia económica como también pueden ser microorganismos benéficos para las plantas y el ambiente. *P. fluorescens* es junto a *P. putida* la más estudiada, por su capacidad para fijar nitrógeno libre en el suelo y también por ser fuente de uno de las proteínas más revolucionarias para el estudio de la función celular: la proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés). Las dos especies mencionadas han sido usadas como inóculos para promover el crecimiento vegetal y con ello aportar sostenibilidad a la agricultura al prescindir del uso de químicos y el mejoramiento del suelo (Li et. al., 2017).

Burkholderia gladioli: Esta cepa pertenece al amplio género *Burkholderia*, compuesto de hasta al menos 30 cepas que tienen importancia económica, médica y ambiental. Algunas de éstas, como la *B. cepacia*, ha sido encontrada en pacientes con fibrosis quística provocando infecciones, otras provocan enfermedades en las plantas como *B. glumae*, las hay también algunas que son promotoras del crecimiento vegetal y otras que pueden usarse en biorremediación. *B. gladioli* fue establecida recientemente como patógeno humano, aunque es susceptible al sistema inmunológico, pero no ha sido reportada como patógeno del cultivo de caña de azúcar (Stoyanova et.al.,2007). Sin embargo; investigaciones realizadas en México, revelaron que *B. gladioli* es el agente causal de dos enfermedades en el maíz conocidas como rayado de la hoja y la pudrición del tallo, por lo que sospechamos que también pudiera resultar patógena para la caña, debido a que ambas especies vegetales pertenecen a la familia de las gramíneas (Gijón et. Al., 2016).

Bacillus amyloliquefaciens: Los *Bacillus*, son uno de los grupos más extendidos y cosmopolitas, se encuentran en casi todos los ambientes y viven en amplios rangos de temperatura lo que revela su alta capacidad genética y ambiental. Lo anterior conlleva a considerar a este grupo de microorganismos de alto interés para usos aplicados como biofertilizantes y biopesticidas, bioproductos que ya están disponibles en el mercado agrícola y que han tenido buena aceptación. Una de las características de mayor importancia es que las cepas de *Bacillus* no son patógenas para humanos. En el caso de *Bacillus amyloliquefaciens* se adapta bien a la rizósfera y secreta sustancias extracelulares que promueven el crecimiento vegetal, protege con antifúngicos y promueve la inmunidad sistémica vegetal (Niazi et. al. 2014).

4. CONCLUSIONES

Usando un enfoque de investigación de microbiología clásica y biología molecular, se logró obtener una aproximación de la biodiversidad asociada al cultivo de la caña de azúcar, la mayoría de éstos asociados a las raíces y a las hojas del cultivo.

La identificación molecular de los microorganismos permitió conocer con precisión la identidad de éstos, de fundamental importancia para comprender su función biológica y ecológica para la caña de azúcar en la zona de estudio.

La asociación de los microorganismos identificados con la caña de azúcar, revela que hay presencia de patógenos, pero también de microorganismos potencialmente benéficos y que no han sido reportados para Nicaragua

REFERENCIAS

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215:403-410. PubMed.

IV Censo Nacional Agropecuario, 2011. Revisado el 5 de marzo de 2017 en <http://www.inide.gob.ni/Cenagro/INFIVCENAGRO/IVCENAGROINFORME/assets/basic-html/index.html#1>.

Cenicaña. 2013. Casos de cogollo retorcido no deben preocupar a cultivadores Recuperado 05 de septiembre del 2016 de (http://www.cenicana.org/noticias/2013/cogollo_retorcido_2013.php)

Dean R. A. et al. (2014) Genomics of Plant-Associated Fungi: Monocot Pathogens, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

de Souza, RS; Okura, VK; Armanhi, JS; Jorrin, B; Lozano, N; da Silva, MJ; González-Guerrero, M; de Araujo, LM; Verza, NC; Bagheri, HC; Imperial, J; Arruda, P. (2016). "Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome". Scientific Reports."

Gijon-Hernandez, A., Teliz-Ortiz, D., Mejia-Sanchez, D., De La Torre-Almaraz, R., Cardenas-Soriano, E., De Leon, C. and Mora-Aguilera, A. (2011), Leaf Stripe and Stem Rot Caused by *Burkholderia gladioli*, a New Maize Disease in Mexico. *Journal of Phytopathology*, 159: 377–381.

Houbraken Jos A. M. P.; Frisvad Jens C. & Samson Robert A. (2010) Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. *Fungal Diversity* 44:117–133.

Li Hai-Bi , Singh Rajesh K., Singh Pratiksha, Song Qi-Qi, Yong-Xiu Xing Li H-B, Singh RK, Singh P, Song Q-Q, Xing Y-X, Yang L-T and Li Y-R (2017) Genetic Diversity of Nitrogen-Fixing and Plant Growth Promoting *Pseudomonas* Species Isolated from Sugarcane Rhizosphere. *Front. Microbiol.* 8:1268.

Madigan MT; Martinko J and Parker, Jack. (2004) Brock:Biología de los microorganismos. Pearson Educación, Décima edición, Madrid, España.

NETAFIN (2001) Requerimientos de suelo. Recuperado el 21 de 01 de 2016, de Requerimientos de suelo: http://www.sugarcane crops.com/s/soil_requirement/

Niazi A, Manzoor S, Asari S, Bejai S, Meijer J, (2014) Genome Analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* Subsp. *Plantarum* UCMB5113: A Rhizobacterium That Improves Plant Growth and Stress Management. *PLOS ONE* 9(8)

Perrone G., Susca A., Cozzi G., Ehrlich K., Varga J. Frisvad J.C., Meijer M., Noonim, P. W. Mahakarnchanakul and Samson R.A.. (2007) Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Mycology* 59: 53–66.

Song X. B. Zhang, L. H., Peng A. T., Cheng B. P., and Ling J. F. (2016) First Report of *Paecilomyces variotii* Isolated From Citrus Psyllid (*Diaphorina citri*), the Vector of Huanglongbing of Citrus, in China. *Plant Disease* 100:12, 2526.

Stoyanova M., Pavlina I., Moncheva P. & Bogatzevska N. (2007) Biodiversity and Incidence of *Burkholderia* Species, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 21:3, 306-310.

SEMBLANZA DE LOS AUTORES



Cándido Leoncio Vanegas-Carrero: Realizo estudios de Agronomía en el Instituto Técnico Vocacional Manuel Ignacio Lacayo , León – Nicaragua, posteriormente obtuvo el grado de Administrador de Empresas en la Universidad de Ciencias Comerciales, Nicaragua, trabajo para el Ministerio de Agricultura (MAG), Instituto de Desarrollo Rural IDR, atendiendo el desarrollo rural en proyectos agropecuarios. Los estudios de maestría los desarrollo en la Universidad Nacional de Ingeniería, Nicaragua. Desde donde apoya la investigación e innovación con estudiantes de la carrera de Ingeniería Agrícola, aportando con ello a la investigación estudios en el cultivo de papa y bioinsumo.



Julio Antonio Gómez Rodríguez: realizó estudios de Biología en la UNAN-León, posteriormente obtuvo el grado de Máster en Ingeniería Química en el Instituto Químico de Sarriá, en Barcelona, España. Actualmente, estudia un Máster en Propiedad Intelectual e Innovación en la Universidad de San Andrés, en Buenos Aires, Argentina. Fue investigador del Centro de Biología Molecular de la UCA y se desempeña en el PIAG-UNI como especialista de proyectos, enfocándose en el desarrollo de bioinsumos de uso agrícola e industrial, innovación agropecuaria y gestión de la propiedad intelectual.