

# EVALUACIÓN DE TRES MÉTODOS DE INOCULACIÓN DE *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, EN CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum* spp.)

## EVALUATION OF THREE INOCULATION METHODS WITH *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, IN SUGAR CANE (*Saccharum* spp.)

López-Vázquez, J.J.<sup>1</sup>; Valdez-Balero, A.<sup>1\*</sup>; Silva-Rojas, H.V.<sup>2</sup>; Flores-Revilla, C.<sup>3</sup>; Rangel-Ortega, C.A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados *Campus* Tabasco. <sup>2</sup>Colegio de Postgraduados *Campus* Montecillos.

<sup>3</sup>Centro de Investigación y Desarrollo de Caña de Azúcar (CIDCA, A.C.).

\*Autor de correspondencia: apoloniouv@colpos.mx

### RESUMEN

El cultivo de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) es afectado por enfermedades que causan efectos negativos en su producción, sobresaliendo la escaldadura de la hoja causada por la bacteria *Xanthomonas albilineans*. Se han empleado múltiples estrategias para disminuir los daños causados por esta enfermedad, y el uso de variedades resistentes ha sido el método más efectivo de control, sin embargo, no existe un método confiable de inoculación para evaluar las variedades a dicha enfermedad. Se evaluaron los métodos de inoculación, mecánica, inyección y decapitado, en cinco variedades con respuesta conocida de la enfermedad, se aisló y realizó la identificación molecular del agente causal. Los resultados mostraron al agente causal con 99% de identidad y que el método de inoculación por decapitado registró la incidencia de 6.87% y severidad de 4.53%, con diferencias significativas respecto a los dos métodos restantes.

**Palabras clave:** Bacteria en caña, escaldadura, método de inoculación.

### ABSTRACT

Sugar cane (*Saccharum* spp.) cultivation is affected by diseases that cause negative effects in its production, among which leaf scalding caused by the bacteria *Xanthomonas albilineans* stands out. Multiple strategies have been used to decrease the damages caused by this disease, and the use of resistant varieties has been the most effective method for control; however, there is no reliable method for inoculation to evaluate the varieties in the disease. The inoculation methods, mechanical, injection and decapitation, were evaluated in five varieties with a known response to the disease, the causal agent was isolated and its molecular identification was performed. The results showed the causal agent with 99 % of identity and that the inoculation method by decapitation showed an incidence of 6.87 % and severity of 4.53 %, with significant differences compared to the two other methods.

**Keywords:** sugar cane bacteria, scalding, inoculation method.

**Agroproductividad:** Vol. 9, Núm. 7, julio, 2016. pp: 62-67.

**Recibido:** marzo, 2016. **Aceptado:** junio, 2016.

## INTRODUCCIÓN

**La caña de azúcar** (*Saccharum* spp.) es de los principales cultivos de importancia económica en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Barnabas *et al.*, 2015). Se cultiva en más de 130 países, Brasil el mayor productor con un aporte del 28% del total de la producción, seguido por la India, China, Tailandia, México y Pakistán. México ocupa el quinto lugar a nivel mundial con 735,520 hectáreas cosechadas y una producción de 53'599,827 t, con rendimiento promedio nacional de 68.409 t ha<sup>-1</sup> (ATAM, 2016). El cultivo es afectado por inadecuada fertilidad del suelo, mal drenaje, toxicidad por productos químicos, sequía, así como, por hongos, bacterias, virus, fitoplasmas y nemátodos; los cuales pueden afectar considerablemente la productividad, si no se realiza un manejo preventivo adecuado (Juárez y Valdez, 2000). La escaldadura de la hoja causada por la bacteria *Xanthomonas albilineans* es una enfermedad de importancia por sus efectos negativos en el rendimiento agrícola y calidad del jugo, y se estiman pérdidas de 90% a 100% (Ricaud y Ryan, 1989; Hoy y Grisham, 1994) sobre todo en variedades altamente susceptibles. En variedades moderadamente susceptibles ocasionan pérdidas de campo de hasta 15%, afectando el Brix y degradando la sacarosa (Flores-Cáceres, 1997; Rott *et al.*, 1997; Lopes *et al.*, 2001; Iglesia *et al.*, 2003; Huerta-Lara, 2004). La escaldadura de la hoja es una enfermedad que presenta diversos tipos de síntomas por lo cual en ocasiones se dificulta su diagnóstico, sin embargo existen cuatro síntomas básicos (Flores-Cáceres, 2000 y Huerta-Lara, 2004): **Fase eclipse:** El síntoma es visible en las hojas jóvenes, se caracteriza por que aparecen rayas blancas foliares, no se observa ningún síntoma y en una misma planta puede registrarse como enferma o sana, dependiendo del momento en que se realiza la evaluación de la enfermedad. **Fase latente:** La parte interna de los tallos maduros pueden mostrar una coloración rojiza de los haces fibrovasculares, especialmente en los nudos de los canutos, parecida al síntoma del raquitismo de las socas. Durante esta fase no se presenta ningún tipo de síntoma externo y su exacto diagnóstico, requiere del aislamiento del organismo y de pruebas serológicas. Esta fase ocurre en la mayoría de los casos en variedades resistentes o moderadamente resistentes. **Fase crónica:** El síntoma clásico de la enfermedad se caracteriza por presentar rayas blanquecinas, finas y bien definidas, se puede presentar una o varias de ellas y se distribuyen en forma paralela a la nervadura de la hoja, en algunos casos pueden extenderse hacia la vaina de la hoja. Una sola cepa presenta con frecuencia tallos enfermos y sanos; los primeros detienen su crecimiento y pueden producir brotes laterales o "lalas", las cuales son generalmente cloróticas y no sobreviven al sembrarse. **Fase aguda:** Se caracteriza por la muerte súbita de la planta sin mostrar síntomas crónicos, ésta generalmente se presenta en condiciones de estrés hídrico, lo cual es favorable para el patógeno.

treos realizados por Valdez-Balero (2010), en los ingenios Santa Rosalía y Benito Juárez en el estado de Tabasco, México, ubicaron a la enfermedad en las variedades Mex 68-P-23, Mex 79-431 y CP 72-2086. Numerosas estrategias han sido planteadas para intentar disminuir los daños económicos ocasionados por esta bacteria en diferentes regiones del mundo, sin embargo, no existe un método confiable para evaluar la respuesta de las variedades de caña de azúcar a la enfermedad de la escaldadura de la hoja. No obstante, el uso de variedades resistentes constituye el mejor método de control de la enfermedad (Rott *et al.*, 1995). Debido a lo anterior, se evaluó cual es el método confiable para inocular y evaluar la respuesta de las variedades de caña de azúcar a la escaldadura de la hoja.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Campo Experimental del Colegio de Posgraduados-Campus Tabasco, ubicado en el Km 21 de la carretera Cárdenas-Coatzacoalcos. El clima es cálido húmedo con abundantes lluvias en verano (Am), ubicado a 17° 59' 10.20" N y 93° 35' 36.69" y 10 m de altitud. Como material vegetativo se utilizaron cinco variedades comerciales de caña de azúcar, con diferentes niveles de resistencia la enfermedad. Cuatro variedades susceptibles (positivas) y una resistente (negativa) (Cuadro 1). Se sembraron a cordón doble, bajo un diseño de bloques completos al azar, con cuatro repeticiones. La unidad experimental fue un surco de 10 m de largo. La distancia entre variedades fue de 1.4 m entre surcos. Para cada método de inoculación se consideraron 100 plantas.

La enfermedad está presente en áreas cañeras de los países productores (Rott *et al.*, 1995). En México fue detectada en la variedad Mex 64-1487 en 1992, en las zonas de abastecimiento de los ingenios La Gloria y El Modelo, en Cardel, Veracruz, México. Posteriormente fue observada en la variedad SP 70-1284 en Tres Valles, Veracruz (Irvine *et al.*, 1993). Los últimos mues-

## Selección de muestras y aislamiento de la bacteria

### *X. albilineans*

En los campos cañeros del ingenio Benito Juárez, S. A. (Cárdenas, Tabasco). Se recolectaron hojas, tallos, yemas y brotes de las variedades CP 72-2086, MEX 69-290, MEX 79-431 y MEX 68-P-23 que mostraron síntomas visibles de la enfermedad. De un total de 27 muestras se aisló la bacteria y se usó medios NBY (caldo nutriente-agar extracto de levadura) y B de King (Shaad, 2001).

### Identificación molecular mediante la técnica de PCR

La identificación molecular se realizó utilizando los primers universales 8F (5´-AGTTGATCCT-GGCTCAG-3´) y 1492R (5´-ACCTT-GTTACGACTT-3´) para amplificar un fragmento de 1500 pares de bases (bp) de la subunidad pequeña del DNA ribosomal 16S rDNA (Saccchi *et al.*, 2002). La extracción del DNA se llevó a cabo en el Laboratorio de Semillas del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Se utilizó el método de Bromuro de Hexadecyltrimetilamonio (CTAB al 2%). La PCR se preparó para un volumen de 25  $\mu\text{L}^{-1}$ , utilizando, 5  $\mu\text{L}^{-1}$  de buffer 5x, 2.0  $\mu\text{L}^{-1}$  dNTP's (2.5  $\mu\text{L}^{-1}$ ), 2.0  $\mu\text{L}^{-1}$  primer 8F (10 pM), 2.0  $\mu\text{L}^{-1}$  primer P1492R (10 pM), 0.4  $\mu\text{L}^{-1}$  Taq polimerasa (5u), 3  $\mu\text{L}^{-1}$  DNA (100 ng) y 10.6  $\mu\text{L}^{-1}$  de agua deionizada estéril. La PCR se llevó a cabo en un termociclador (Biorad, USA) utilizando el siguiente programa: una desnaturalización inicial de 95 °C, por 2 minutos, seguida de 35 ciclos: 95 °C por 2 min, 59 °C por un minuto, 72 °C por 1.5 minuto y extensión final a 72 °C, por 5 min. El producto obtenido fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 2%, los productos amplificados se observaron en

**Cuadro 1.** Variedades de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) y su respuesta a la escaldadura de la hoja causado por *Xanthomonas albilineans*.

Variiedad	Respuesta a la enfermedad
MEX 69-290	Moderadamente susceptible
CP 72-2086	Moderadamente susceptible
Mex 68-P-23	Moderadamente resistente
MEX 79-431	Moderadamente resistente
CO 997	Resistente

Fuente: Flores *et al.* (2000).

Terminator 3.1 y la resolución de fragmentos amplificados se llevó a cabo en un DNA analyzer de cuatro capilares (applied Biosystem, USA).

El inóculo se preparó agregando 10  $\text{mL}^{-1}$  de agua destilada estéril a cada una de las cajas Petri, de seis días de crecida la bacteria pura. La suspensión se estandarizo a 0.2 de densidad óptica a una concentración de  $10^{-7}$  Unidades Formadoras de Colonias (CFU)  $\text{mL}^{-1}$ . Para evaluar los métodos de inoculación, se emplearon los métodos de transmisión mecánica (machete), inyección y decapitado. La Transmisión mecánica (machete) consistió en cortar la planta de la caña a nivel de suelo, utilizando un machete que fue sumergido en el inóculo a una concentración de  $9 \times 10^{-7}$  CFU  $\text{mL}^{-1}$  en una cubeta plástica con una capacidad de 20 litros (Figura 1a). Posteriormente, se procedió a cortar los tallos en la base (Figura 1b).

**Inyección:** Consistió en aplicar un  $\text{mL}^{-1}$  del inóculo mediante el uso de una suspensión bacteriana de *X. albilineans* a una concentración de  $9 \times 10^{-7}$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ . Se aplicó la suspensión a las plantas, con jeringa después del último collar visible cercano al meristemo (Figura 2).

**Decapitado:** Este método se efectuó realizando un corte transversal con tijeras de podar cercano al cogollo sin llegar al punto de crecimiento del tallo, entre la tercera y cuarta lígula visible. Después del corte del tallo, se procedió a colocar una porción de algodón humedecido con la suspensión bacteriana a una concentración de  $9 \times 10^{-7}$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  (Figura 3).



**Figura 1.** A: machete sumergido en el inóculo. B: Corte de tallos con machete.



**Figura 2.** Aplicación del inóculo por el método de inyección, mediante el uso de una jeringa hipodérmica en la base del tallo.



**Figura 3.** Aplicación del inóculo mediante decapitado.

### Variables respuesta

Se midió la incidencia y severidad en las cinco variedades comerciales de caña de azúcar con mediciones mensuales haciendo un total de siete muestreos. La incidencia se expresó en porcentaje, de acuerdo a la relación de tallos enfermos (síntomas visibles) con el total de la población (tallos enfermos+tallos sanos) mediante la siguiente fórmula:

$$P.I. = 100 \times (\sum TA / \sum TT)$$

Dónde: **P.I.**=Porcentaje de incidencia de la enfermedad (%);  $\sum TA$  = Tallos enfermos (afectados) y  $\sum TT$  = Total de tallos (tallos enfermos+tallos sanos).

La severidad se determinó mediante la escala propuesta por Chavarría (2006), y las evaluaciones se realizaron mediante observaciones mensuales (Cuadro 2). El análisis estadístico se hizo mediante varianza simple, y la comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de las 27 muestras obtenidas mediante la técnica de PCR con los iniciadores 8F y 1492R permitieron amplificar 1500 bp del gen 16S rDNA ribosomal, se utilizaron dos marcadores (Figura 4). Los resultados de la secuenciación identificó la bacteria *X. albilineans* con un porcentaje de identidad del 99% con las secuencias depositadas en la base de datos de GenBank.

### Incidencia

El método de inoculación que presentó alto porcentaje de incidencia a la enfermedad de acuerdo a los resultados obtenidos, fue el de inoculación por decapitado (A) con un promedio de 6.87%, con diferencia significativa en comparación con los métodos restantes (Figura 5). Mientras que, para el método por inyección (B), y transmisión mecánica (C), los valores medios fueron 3.6% y 2.33% respectivamente.

### Severidad

La severidad se evaluó, debido a que la enfermedad de la escaldadura puede estar presente en la fase eclipse y posteriormente desaparecen los síntomas visibles de la enfermedad y por tanto bajan los rendimientos del cultivo. La

**Cuadro 2.** Escala de evaluación para determinar la reacción a la enfermedad de la escaldadura.

Grado	Reacción	Descripción
1	Resistente (R)	Sin síntomas visibles
2	Moderadamente resistente (MR)	Rayas blanquecinas o amarillentas en la lámina foliar 1% hasta un 5%
3	Moderadamente susceptible (MS)	Rayas blanquecinas o amarillentas y /o quemadas 6% hasta un 15% de tejido foliar
4	Susceptible (S)	Entre un 16% a 30% del área foliar quemada
5	Altamente susceptible (AS)	Más de un 31% del área foliar quemada y con emisión de brotes laterales.

Fuente: Chavarría (2006).

severidad de la enfermedad de la escaldadura de la hoja en las cinco variedades mostró que el método de inoculación por decapitado (A), registró mayor severidad con 4.53% con diferencia significativa, seguido por el método de inyección (B) con 2.13% y la transmisión mecánica (C) con 1.07% (Figura 6).

## CONCLUSIONES

El medio B de King permitió el aislamiento y crecimiento de la bacteria de *X. albilineans*. Los iniciadores 8F y 1492R permitieron la amplificación del gen 16S del rDNA y la secuenciación confirmó la identidad de la bacteria *X. albilineans* con 99% de máxima identidad. El método de inoculación por decapitado fue el de mayor porcentaje e infección.

## AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación y Desarrollo de la Caña de Azúcar, A.C. (CIDCA, A.C.) por su apoyo técnico y financiero para la realización del presente trabajo de investigación.

## LITERATURA CITADA

Asociación de Técnicos Azucareros de México A.C. (ATAM). 2016. Manual Azucarero Mexicano. Ed. 59. Compañía Editora del Manual Azucarero S. A. de C.V. 495 pp.

Barnabas L., Ramadass A., Amalraj R. S., Palaniyandi M., Rasappa V. 2015. Sugarcane proteomics: An update on current status, challenges, and future prospects. *Proteomics* 15: 1658-70.

Chavarría S.E. 2006. Escalas Descriptivas para la Evaluación de Enfermedades de la Caña de Azúcar. San José, Costa Rica, 33 pp.

Chávez M.R. 2000. Resistencia Varietal a la enfermedad de escaldadura de la caña de azúcar4 (*Xanthomonas albilineans*), Programa Nacional de Variedades del FOCYTCAÑA, México, D.F., 49-66 pp.

Flores-Cáceres S., Ojeda-Ruiz A., Flores-Revilla C., Juárez-López F., Valdez-Balero A., Ayala-González F., Marín-Sánchez R., Chávez-Morales R. 2000. Proyecto para determinar la resistencia al mosaico, la roya, el carbón la escaldadura de la caña de azúcar. Programa Nacional de variedades del FOCYTCAÑA. 85 pp.

Hoy J.W., Grisham M.P. 1994. Sugarcane leaf scald distribution, symptomatology, and effect on yield in Louisiana, *Plant Disease*, 78: 1083-1087.

Huerta-Lara M., Ortega-Arenas L.D., Landeros-Sánchez C., Fucikovsky-Zak L., Marín-García M. 2003. Respuesta de 10 variedades de caña de azúcar a la escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans* (Ashby Dowson) En la región central costera de Veracruz. *Agrociencia* 37: 511-519.

Iglesia A., Díaz M., Álvarez E., Peralta E.L., Pazos V. 2003. Optimización del diagnóstico múltiple de la escaldadura foliar y el raquitismo de los retoños de la caña de azúcar. *Revista Protección Vegetal*. 18: 15-18.

Irvine J.E., Amador J.M., Gallo M.I.R., Riess C., Comstock J.C. 1993. First report of leaf scald, caused by *Xanthomonas albilineans*, of sugarcane in Mexico. *Plant Disease* 77: 846

Juárez-López F., Valdez-Balero A. 2000. Resistencia varietal a la enfermedad de la roya de la caña de azúcar (*Puccinia melanocephala*). Programa nacional de variedades del FOCYTCAÑA. 84 p.

Lopes S.A., Damann K.E., Hoy J.W., Grisham M.P. 2001. Infectivity titration for assessing resistance to leaf scald among sugarcane cultivars. *Plant Disease* 85: 592-596.

Ricaud C., Ryan C.C. 1989. Leaf scald: *In: Diseases of sugarcane. Major diseases*. Editions: C Ricaud, BT Egan, AG Gillaspie Jr & C.G Hughes. Amsterdam. The Netherlands: Elsevier Science Publishers: 39-58.

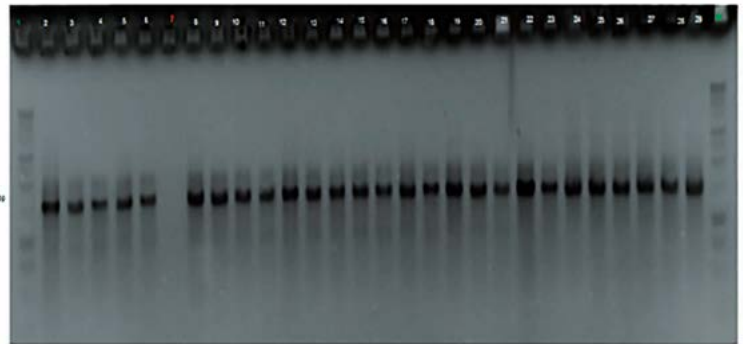


Figura 4. Amplificación de la banda correspondiente al gen 16S rRNA de ~1,500 bp de bacterias aisladas de caña de azúcar.

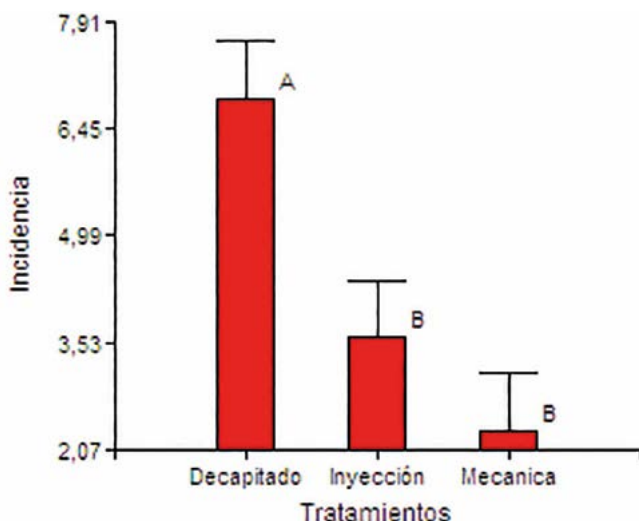


Figura 5. Respuesta de los métodos de inoculación considerando la incidencia de la bacteria *Xanthomonas albilineans*.

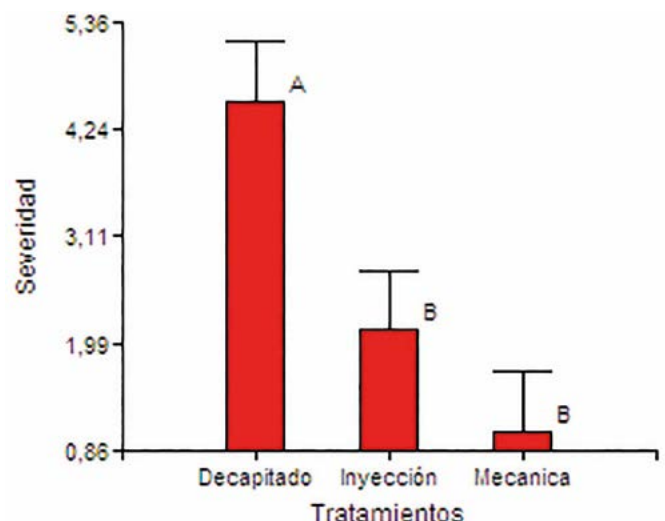


Figura 6. Respuesta de los métodos de inoculación considerando la severidad a la infección con la bacteria *Xanthomonas albilineans*.

- Rott P., Soupa D., Brunet Y., Feldmann P., Letourmy P. 1995. Leaf scald (*Xanthomonas albilineans*) incidence and its effect on yield in seven sugarcane cultivar in Guadalupe. *Plant Pathology* 44: 1075-1084.
- Rott P., Mohaemd I.S., Klett P., Soupa D., De Saint-Albin A., Feldman P., Letourmy P. 1997. Resistance to leaf scald disease is associated with limited colonization of sugarcane and wild relatives by *Xanthomonas albilineans* *Phytopathology* 87:1202-1213.
- Sacchi C.T., Whitney A.M., Mayer L.W., Morey R., Steigerwalt A., Boras A., Weyant R.S., Popovic T. 2002. Sequencing of 16S rRNA gene: a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. *Emerging Infectious Diseases* 8: 1117-1123.
- Schaad N.W., Freederick R.D., Shaw J., Schneider W.L., Hickson R., Petrillo M.D., Luster D.G. 2003. Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. *Annual Review. Phytopathology*. 41: 305-324.
- Shaad N.W., Jones J.B., Lacy G.H. 2001. Gram negative bacteria. En: *Laboratory Guide for Identification Of. Plant Pathogenic Bacteria*. Editado por Shaad, N.W., Jones, J.B. y Chun. 3a Edición. The American Phytopathological Society, APS. St. Paul, Minnesota. USA.
- Valdez-Balero A. 2010. Reporte técnico de la enfermedad de la escaldadura (*Xanthomonas albilineas*) y gomosis (*Xanthomonas vascularum*). Colegio de Postgraduados-Campus Tabasco.

