

## PRESENCIA DE *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson EN CAÑA DE AZÚCAR EN LA CHONTALPA, TABASCO, MÉXICO

## PRESENCE OF *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson IN SUGARCANE CROPS IN LA CHONTALPA, TABASCO, MÉXICO

H. Salomón García-Juárez<sup>1</sup>, Carlos F. Ortiz-García<sup>1\*</sup>, Sergio Salgado-García<sup>1</sup>, Apolonio Valdez-Balero<sup>1</sup>, Hilda V. Silva-Rojas<sup>2</sup> y Werner R. Ovalle-Sáenz<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Campus Tabasco, Colegio de Postgraduados. Periférico Carlos A. Molina S/N. 86500, H. Cárdenas, Tabasco, México. <sup>2</sup>Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. Km. 36.5 Carretera México- Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México. <sup>3</sup>Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar. Km. 92.5 Carretera Escuintla-Mazatenango. Santa Lucía, Escuintla, Guatemala.

\*Autor de correspondencia (cfortiz@colpos.mx)

### RESUMEN

Una de las enfermedades agresivas de la caña de azúcar es la escaldadura de la hoja causada por *Xanthomonas albilineans* (*Xa*). En las zonas cañeras del estado de Tabasco, México, no se tienen registros de afectaciones por *Xa*. Por ello el objetivo de este trabajo de investigación fue determinar la presencia de *X. albilineans* en los principales clones comerciales, y conocer la dispersión de la enfermedad en la zona cañera de La Chontalpa, Tabasco. Se llevó a cabo un muestreo dirigido para cinco clones (MEX 69-290, MEX 79-431, MEX 68-P-23, CP 72-2086 y RD 75-11), cuatro tipos de suelo (Cambisol, Vertisol, Gleysol y Fluvisol) y dos rangos de lluvia (1793-1936 mm y 1937-2085 mm). Un total de 105 plantaciones fueron seleccionadas y georreferenciadas, y se colectaron 10 tallos de cada una. El jugo extraído de las partes de los tallos se impregnó en una membrana de nitrocelulosa, que luego se revelaron por el método de inmunoensayo de adsorción de gota. Los resultados muestran la presencia de *Xa* en los tallos de tres clones asintomáticos (MEX 69-290, MEX 68-P-23 y MEX 79-431) con incidencias  $\geq 10\%$  en cuatro plantaciones muestreadas. La distribución de la enfermedad fue en agregado, y ahora localizada al sur de la zona de producción cañera. La enfermedad está en un periodo sintomatológico de latencia en los clones positivos que se consideran tolerantes, que carecen de síntomas visuales en las plantas colectadas. *Xa* fue aislado de clones de caña de azúcar susceptibles (EMEX00-21 y CXZ7564) con síntomas foliares de "línea de lápiz". El análisis molecular mediante amplificación de un fragmento de 16S rDNA (1392 pb) dio similitudes máximas con las secuencias de *Xa* registradas en el Genbank. Este estudio constituye el primer reporte de la presencia de *Xa* en Tabasco, México, confirmado a nivel molecular.

**Palabras clave:** *Xanthomonas albilineans*, escaldadura de la hoja, caña de azúcar.

### SUMMARY

One of the aggressive diseases of sugarcane is leaf scald caused by *Xanthomonas albilineans* (*Xa*). Despite some studies, the State of Tabasco is not known to be affected by *Xa*. Therefore, the objective of this work was to search for *Xa* in Tabasco, México, and its distribution. We selected a sugarcane production zone located in La Chontalpa region and carried out a direct sampling in five sugarcane clones (MEX 69-290, MEX 79-431, MEX 68-P-23, CP 72-2086 and RD 75-11), four soil types (Cambisol, Vertisol, Gleysol and Fluvisol) and two rainfall

regimes (1793-1936 mm and 1937-2085 mm). A total of 105 sites were selected and located. Samples of 10 stalks were randomly selected in each plantation. Juice extracted from stalk pieces was impregnated on a nitrocellulose membrane, and then revealed by the "Dot blot immunoassay" method. Results showed the presence of *Xa* in the stems of three asymptomatic clones (MEX 69-290, MEX 68-P-23 y MEX 79-431) with incidences  $\geq 10\%$  in four sampling sites. The distribution of the disease was of the aggregated type, and currently located only at the southern part of the sugarcane production zone. The disease is now in a symptomatic latent period in the positive clones considered tolerant, which lack visual symptoms in the sampling sites. The *Xa* isolated from two susceptible sugarcane clones (EMEX00-21 and CXZ7564) showed the "pencil lines" symptom in leaves. The molecular analysis performed by amplifying a segment of the 16S rDNA (1392 bp). Maximal similarities were found when compared to sequences of *Xa* registered in the GenBank. This study is the first report of the presence of *Xa* in Tabasco, México, confirmed at molecular level.

**Index words:** *Xanthomonas albilineans*, leaf scald, sugarcane.

### INTRODUCCIÓN

La escaldadura de la hoja es una enfermedad vascular ocasionada por la bacteria *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, que fue detectada por primera vez en la década de 1920 en las investigaciones de Wilbrink (1920) en Java, y Northh (1926) en Australia y Fiji (Ricaud y Ryan, 1989). Un aspecto importante de esta enfermedad es que presenta tres formas de expresión de los síntomas (crónica, aguda y latente), que dependen del grado de resistencia del clon infectado (Tokeshi, 1980). Las formas crónica y aguda se manifiestan en clones susceptibles. La forma crónica se caracteriza por la presencia de líneas finas de 0.5 mm de ancho, de bordes bien definidos que se desarrollan en las nervaduras secundarias de las hojas conocidas como "líneas de lápiz", así como la emisión de brotes laterales que según Ovalle (2012) inician desde la base o la parte media del tallo hacia el ápice.

Rott y Davis (2000) consideran que la forma aguda se

caracteriza por el marchitamiento súbito de las plantas las cuales mueren repentinamente sin haber presentado otro tipo de síntomas; mientras que la forma latente presenta un periodo de incubación muy largo en plantas infectadas en el ciclo de plantilla y manifiesta síntomas hasta el año siguiente en el ciclo de soca, lo que dificulta detectar su llegada y favorece la diseminación de la bacteria. La diseminación se da fundamentalmente por el empleo de tallos infectados como fuente de semilla, de instrumentos de corte y maquinaria agrícola infectados con la bacteria (Ricaud y Ryan, 1989). Esta enfermedad, en fase aguda, reduce los rendimientos de campo, afecta la calidad de los jugos y sobre todo produce pérdidas estimadas entre 90 y 100 % (Hoy y Grisham, 1994).

En México la escaldadura de la hoja se detectó por primera vez en 1992 en el clon MEX 64-1487 cultivado en el estado de Veracruz (Irvine *et al.*, 1993). Luego Flores (1997) reportó la presencia de dicha enfermedad en los estados de Veracruz, Morelos y Chiapas, en donde la región cañera de Cardel y Úrsulo Galván en Veracruz fue la más afectada al haber causado la eliminación de 800 ha sembradas con el clon susceptible MEX 64-1487. Ello dio origen a estudios del comportamiento genético de los principales clones comerciales cultivados en México ante esta enfermedad. Así, Chávez (2000) reportó al clon CP 72-2086 como resistente, a los clones MEX 69-290 y MEX 68-P-23 como tolerantes, y a los clones RD 75-11 y MEX 79-431 como moderadamente resistentes. Por su parte, Huerta *et al.* (2003) calificaron a los clones MEX 69-290, MEX 68-P23 y MEX 64-1487 como susceptibles, a los clones CP 72-2086 y RD 75-11 como resistentes, y al clon MEX 79-431 como parcialmente resistente; aunque ambos estudios se realizaron en la misma región cañera y con la misma metodología.

Pese a esto, 27,800 ha de la zona cañera de La Chontalpa en el estado de Tabasco están cultivadas con dichos clones, lo que de acuerdo con Rott y Davis (2000) y Salgado *et al.* (2009) hace que la zona sea de alta vulnerabilidad al ataque en la forma latente de *X. albilineans*. Con base en lo anterior y a los señalamientos de tallos con algunos síntomas semejantes a los descritos para dicha enfermedad, sin la existencia de evidencia científica que hubiesen confirmado la presencia de la bacteria *X. albilineans*, se desarrolló la presente investigación con el objetivo de determinar la presencia de *X. albilineans* en los principales clones comerciales, y de conocer la dispersión de la enfermedad en la zona cañera de La Chontalpa, Tabasco.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio y puntos de muestreo

El estudio se llevó a cabo en la zona productora de caña

de La Chontalpa, que es zona de abasto de los ingenios azucareros Presidente Benito Juárez con 18,360 ha y Santa Rosalía con 10,903 ha (INFOCAÑA, 2014). Dicha zona está en el polígono ubicado entre las coordenadas 17° 15' y 17° 40' N y 90° 59' y 94° 06' O, cuyo clima es cálido húmedo [Am(i)g], con promedios anuales de temperatura y precipitación de 26 °C y 2163 mm, respectivamente (Salgado *et al.*, 2009).

El muestreo dirigido para sondear la heterogeneidad ambiental se hizo considerando tres factores: cinco clones comerciales mayormente cultivados (MEX 69-290, MEX 79-431, MEX 68-P-23, CP 72-2086 y RD 75-11), cuatro tipos de suelo (Cambisol, Vertisol, Gleysol y Fluvisol), y dos rangos de lluvia (1793-1936 y 1937-2085 mm). En cada combinación de condiciones se hicieron tres observaciones, sin embargo en una zona no se encontró el tipo de suelo Fluvisol por lo que la toma de muestras se hizo sólo en 105 plantaciones. Los puntos de muestreo y su ubicación en el área de estudio se predeterminaron al sobreponer tres mapas: el del estudio edafoclimático regional, el de georreferenciación de las plantaciones de caña de azúcar, y el mapa de suelos a escala 1:50,000, todos ellos desarrollados en el estudio del SIRDF para la caña de azúcar en dicha región (Salgado *et al.*, 2009).

### Muestreo y procesamiento de las muestras

Las plantaciones correspondientes a cada sitio de muestreo predeterminado se ubicaron con el apoyo de un geoposicionador (GPSmap® 62, Garmin; Taiwan) y a la vez se verificó *in situ* que la edad de la plantación preseleccionada fuese mayor a siete meses. En cada plantación, de forma sistemática se colectó un tallo primario o secundario, de 10 macollos diferentes. De cada uno de los 10 tallos colectados sólo se empleó el tercio distal (punta) para obtener un trozo de entrenudo de 5 cm de largo, del cual se extrajo el jugo mediante presión ejercida con un compresor (TRUPER® COMP-25L, México). El jugo se depositó en una caja Petri estéril y de ahí se obtuvo una alícuota de 2.5 µL para ser impregnado en una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µM (Millipore HAWG047S60®, Germany).

Las muestras impregnadas se fijaron introduciendo las membranas en un horno (RIOSSA H-33™, México) por 1 h a 70 ± 1 °C. Luego, las membranas se procesaron conforme al método descrito por Harrison y Davis (1988) modificado para *X. albilineans* por Ovalle y García (2010). Así, los espacios libres de la membrana se saturaron con una solución de lactosa, seguido de la fijación del primer anticuerpo antiXa LgG policlonal (Montpellier, Francia; CIRAD Bios/UMR Bgpi) para *X. albilineans*, a una concentración de 1:5000 por 1 h. Asimismo se fijó el segundo anticuerpo anticabra IgG anticonejo (SIGMA-ALDRICH®,

USA) conjugado con fosfatasa alcalina en concentración de 1:10000 por maltosa alcalina en solución amortiguadora TBS, por 1 h. Después de los lavados se procedió al revelado de la membrana mediante incubación en 20 mL del sustrato de trabajo, en oscuridad.

Los espacios de deposición de jugo en la membrana que al ser revelados dieron color azul, como sucede en el espacio del testigo positivo, se registraron como muestras positivas e indicaron que en dicho sitio de muestreo existen tallos infectados con la bacteria *X. albilineans*. El testigo positivo fue una suspensión de la bacteria de *X. albilineans*.

#### Aislamiento del agente causal

La bacteria se aisló a partir de tejido foliar con el síntoma “línea de lápiz” con la metodología descrita por Deán (1974). La presencia de la bacteria en el tejido foliar se detectó mediante observación de flujo bacteriano en un microscopio compuesto de contraste de fases (Carl Zeiss Axiostas plus®, Germany). Las muestras se fraccionaron en trozos de 3 cm x 3 mm, y con los bordes previamente impermeabilizados con barniz para uñas, se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio a 3 % durante 5 min, y luego se lavaron tres veces en agua destilada estéril. Los trozos así preparados se cortaron en segmentos más pequeños ( $\pm 2$  mm de largo) sobre dos porta-objetos previamente colocados en cruz y con una película de 330  $\mu$ L de agua estéril, y se dejó en reposo por 5 min. Con una pipeta Pasteur se colectó la suspensión bacteriana y se depositó en cajas Petri con medio agar-nutritivo, y luego fue distribuida con un asa de Digrafsky. Las cajas Petri se incubaron a 30 °C, por un periodo de 10 d en oscuridad.

#### Identificación molecular de *Xanthomonas albilineans*

La extracción de ADN se realizó a partir de colonias puras de la bacteria con 10 d de incubación, conforme al protocolo de Doyle y Doyle (1990). El ADN obtenido fue amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) con los iniciadores 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), que según Janda y Abbott (2007) amplifican un fragmento de 1500 pares de bases (bp). Los productos de PCR amplificados se limpiaron con la enzima ExoSap-IT (Affimetrix, USA) de acuerdo con el fabricante. Posteriormente, en un secuenciador (Applied Biosystems I Prims, modelo 3130 xl, Foster City, CA, USA) de cuatro capilares, la secuencia de bases de ambas hebras se determinaron por electroforesis capilar con los iniciadores externos 8F y 1492R, y también con los ini-

ciadores internos 514F (5'-GTGCCAGCMGCCCGCGG-3') y 800R (5'-CTACCAGGGTATCTAAT-3'). Las secuencias correspondientes a la región 16S rDNA se ensamblaron para crear una secuencia consenso con la opción Cap (Contig assembly program) con el programa BioEdit V.7.0.9.1 (Hall, 1999), la que se comparó con secuencias depositadas en la base de datos de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mediante la opción BLASTN (Zhang *et al.*, 2000).

#### Análisis de datos

El patrón de distribución espacial de la enfermedad se determinó con el índice de Morisita (Badii *et al.*, 2011), el cual se calcula con la ecuación  $I_{\delta} = [\sum n_i (n_i - 1) / n (n - 1)] / N$ , donde  $I_{\delta}$  es el índice de Morisita,  $n_i$  es el número de individuos en la  $i$ ésima unidad muestral,  $n$  es el número de individuos en todas unidades muestrales, y  $N$  es el número de unidades muestrales. Los valores de  $I_{\delta}$  menores, iguales o mayores de 1 indican distribuciones de tipo uniforme, aleatoria y agregada, respectivamente. Además, se hizo la prueba de significancia del índice de Morisita por medio de la ecuación  $Fc = [I_{\delta} (n - 1) + N - n] / (N - 1)$ .

La distribución espacial observada en las plantaciones que resultaron positivas se representó en el mapa generado en el programa Arc.GIS® versión 9.3 (ESRI, Redland, CA, USA), a escala 1:500,000, para lo cual se emplearon y sobrepusieron capas de los factores de suelo y precipitación según Salgado *et al.* (2009). El porcentaje de la incidencia de tallos infectados por plantación (sitio de muestreo) se calculó tomando en cuenta el número de tallos positivos a la bacteria y el total de tallos analizados, con la ecuación donde:  $I$ ,  $n$ ,  $N$ , corresponden a: el porcentaje de incidencia de la bacteria en tallos, el número de muestra con reacción positiva en el análisis serológico, y número total de plantas en el punto de muestreo (Huerta *et al.*, 2003).

Las secuencias nucleotídicas codificantes del gen 16S rDNA de otras especies de *Xanthomonas*, así como de bacterias que afectan al cultivo de la caña de azúcar, descritas y depositadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), se alinearon con la secuencia del fragmento amplificado de la cepa aislada. Los alineamientos múltiples de secuencias nucleotídicas se hicieron con el programa CLUSTAL W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). El alineamiento resultante fue empleado para hacer un dendrograma de similitud con el programa MEGA versión 6.05 (Tamura *et al.*, 2013) que utiliza el método de agrupamiento de Neighbour-joining (Saitou y Nei, 1987) con el índice Poisson (P), para lo cual se hicieron 1000 aleatorizaciones tipo de arranque.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Presencia y distribución espacial de las plantaciones con *X. albilineans*

En la Figura 1 se ubicaron las 105 plantaciones muestreadas, con base en los resultados de las pruebas serológicas: positivas (punto verde) y negativas (punto negro). Las cuatro plantaciones que resultaron positivas evidencian la presencia de *X. albilineans* en la zona cañera de La Chontalpa, Tabasco. Es

relevante hacer notar que tres de los cuatro sitios positivos se ubican en el área sudoeste de la zona, aproximadamente a 2.5 km de distancia entre sí. El cuarto sitio de muestreo positivo se ubica a 9 km al de los otros sitios positivos, en la zona centro del área cañera.

Como el valor de índice de Morisita calculado ( $I_{\delta} = 10.5$ ) es mayor a 1, entonces el patrón de la distribución espacial de los sitios positivos es de tipo agregado, resultado que fue ratificado por la prueba de F en la que se rechazó la

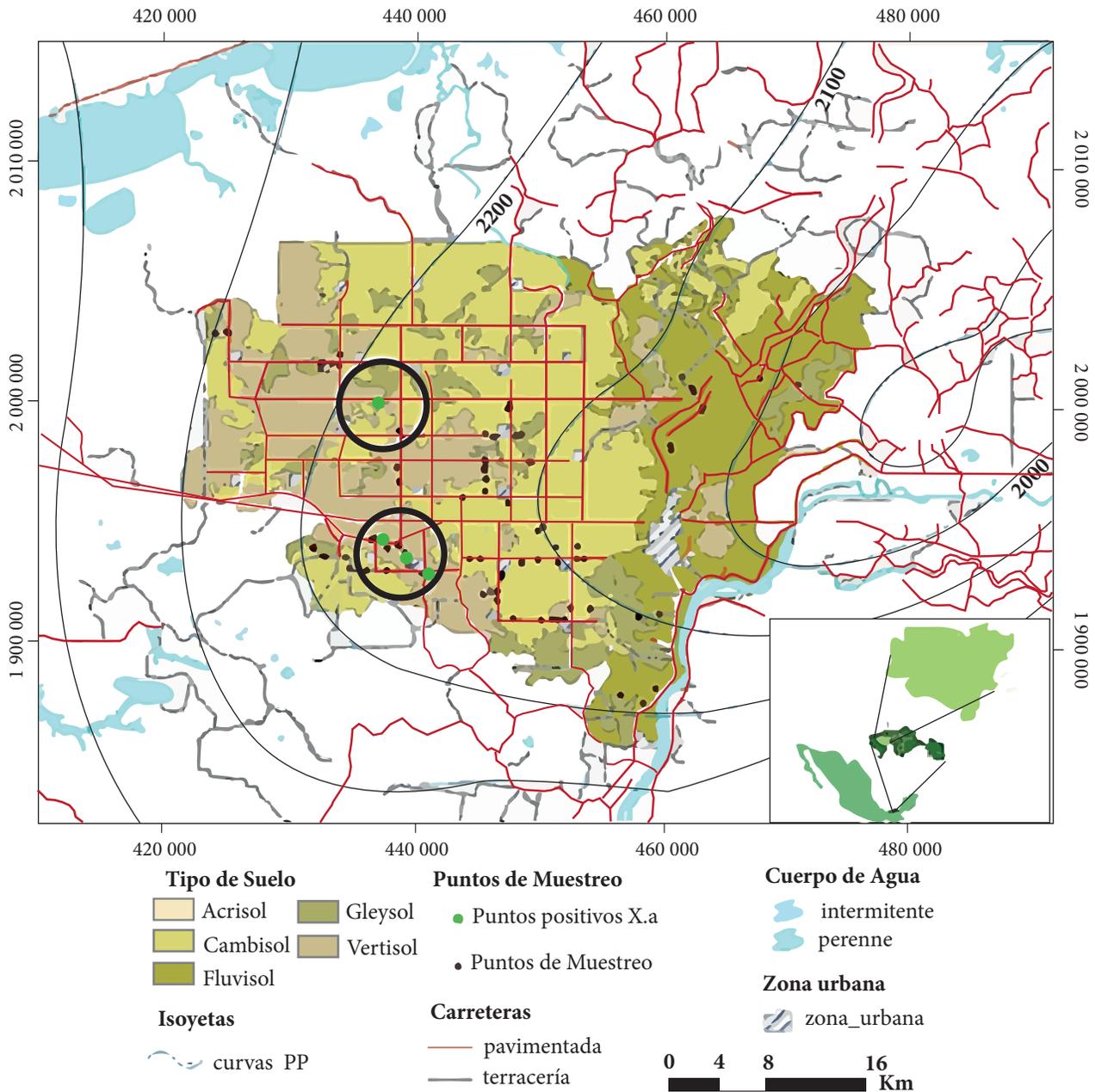


Figura 1. Ubicación de los sitios de muestreo de *X. albilineans* en plantaciones de caña de azúcar de la zona cañera de La Chontalpa, Tabasco, en función del tipo de reacción en el análisis serológico: puntos de muestreo negativos (color café), puntos de muestreo positivos (color verde). Esta figura se generó mediante el programa ArcGis.

hipótesis nula ( $H_0: I_g = 1$ ), según lo propuesto por Badii *et al.* (2011). Al respecto, Taylor (1984) considera que la dispersión agregada es la más comúnmente encontrada en la naturaleza.

Se puede inferir entonces que las plantaciones detectadas positivas con la bacteria se integran en un arreglo de tipo agregado, aunque la dispersión de la bacteria por sí misma no se rija con mecanismos autónomos. Más bien, la dispersión de la bacteria a grandes distancias dependen de la intervención humana, mediante el movimiento de semilla vegetativa infectada y el empleo de herramienta contaminada con la bacteria en labores de campo y zafra (Ricaud y Ryan, 1989). A nivel parcelario, la dispersión puede darse por efecto combinado de viento y lluvia fuertes, los cuales pueden romper los tejidos de tallos infectados y permitir la exposición de la bacteria, la cual es arrastrada por el agua y el viento (Flores, 1977; Ovalle, 2012), en cuyo caso la dispersión sería más bien de contagio.

En este contexto, la llegada de la bacteria al estado de Tabasco se explicaría por la introducción de material vegetativo infectado. Reportes previos de la presencia de la bacteria en México, la ubicaron primeramente en la región cañera de Cardel, Veracruz (Irvine *et al.*, 1993); posteriormente en la Estación de Hibridación en Tuxtla Chico, Chiapas (Flores, 1997); y luego en los estados de Morelos y Oaxaca (Chávez, 2000). Introducciones de varetas de caña de azúcar de 53 clones en diciembre de 2006, que fueron integradas al banco de germoplasma del Programa de Selección de Variedades del Campo Experimental Regional del Centro de Investigación y Desarrollo de la Caña de Azúcar (CIDCA C. A.), provenían de Chiapas (42) y Veracruz (11) ambos reportados con *X. albilineans* (Flores 1997; Gonzáles-Jiménez *et al.*, 2011). Paralelamente se hicieron introducciones a La Chontalpa, de clones de caña de Chiapas y de Colombia (Besosa y Estrada, 2011), y aunque los clones colombianos pasaron un periodo cuarentenario en CIDCA C. A., desde 1993 Colombia tiene problemas con *X. albilineans* (Victoria *et al.*, 1995).

Si bien no se puede precisar el año y punto de llegada de la bacteria a Tabasco, las evidencias permiten inferir que *X. albilineans* pudo ser introducida en material propagativo depositado en alguno de los dos bancos de germoplasma de la región, ya que en ninguno de los reportes se menciona la aplicación de tratamientos hidrotérmicos al menos en el sitio de llegada. Según Huerta *et al.* (2003), los estudios moleculares de diversidad genética podrían servir para dilucidar el origen de las cepas existentes en Tabasco, a partir del aislamiento de distintas procedencias.

Los análisis de las 210 muestras tomadas por clon (10 tallos por 21 sitios) indican que los clones CP 72-2086 y RD

75-11 fueron negativos a la bacteria, lo que podría ser debido a la condición genética del clon, como fue reportado por Chávez (2000) y Huerta *et al.* (2003), o a que estos clones aún no han estado en contacto con la bacteria (Victoria, 1995). En contraste, los clones MEX 69-290, MEX 68-P-23 y MEX 79-431 tuvieron tallos positivos a la bacteria; los clones MEX 69-290 y MEX 79-431 fueron detectados positivos en un tallo por plantación, respectivamente; mientras que en el clon MEX 68-P-23 se detectaron tres tallos con reacción positiva, provenientes de dos plantaciones. Este último clon ha sido relacionado con *X. albilineans* (Irvine *et al.*, 1993; Flores, 1997; Chávez, 2000; Huerta *et al.*, 2003). Además, los cuatro sitios encontrados con tallos positivos cuentan con clones diferentes, lo que permite suponer que se tratan de puntos aislados de dispersión de la bacteria, derivados de un foco primario aún no identificado.

Aunque se conoce que la severidad de la enfermedad dependen de las condiciones ambientales y del estado fisiológico del cultivo de la caña de azúcar (Rott y Davis, 2000), los resultados obtenidos en los cuatro sitios de dispersión de ningún modo pueden ser atribuidos a condiciones particulares de menor régimen de lluvia o por efecto de los suelos Cambisol, Gleisol o Vertisol, ya que las plantaciones positivas corresponden a clones distintos y apenas representan 4 % del área de estudio. Por tanto, es más probable que su presencia en tales sitios se deba a la dispersión humana, y que el foco original sea uno de los sitios positivos o que esté muy cerca de éstos en el sur de la zona cañera de Tabasco.

#### Porcentaje de incidencia de *X. albilineans*

La incidencia mínima detectada en general varió en un rango de 10 a 20 % en las cuatro plantaciones que resultaron positivas (Cuadro 1). Así, mientras que las plantaciones de los clones MEX 69-290 y de MEX 79-431 mostraron incidencias mínima de 10 % en un punto de muestreo, las dos plantaciones positivas el clon MEX 68-P-23 mostraron incidencia de 10 y 20 %.

El desconocimiento de los cañeros acerca de la presencia de la bacteria en la región parece explicar la falta de tratamiento térmico a la semilla previo a la siembra, y la alta vulnerabilidad de la composición clonal de la región cañera de La Chontalpa advertida por Salgado *et al.* (2009). De acuerdo con Ricaud y Ryan (1989), en esta circunstancias se favorece la dispersión regional de la bacteria y pone en riesgo la producción regional sobre todo de los clones susceptibles, dado que la escaldadura influye negativamente en el desarrollo de los retoños y causa pérdidas del rendimiento de campo que varían entre 15 y 20 % (Rott y Davis, 2000).

Además, la escaldadura podría causar pérdidas indirectas

**Cuadro 1. Porcentaje de incidencia de *X. albilineans* en tallos de caña de azúcar, por clon, cantidad de lluvia y tipo de suelo, de las 105 plantaciones muestreadas en la zona de La Chontalpa, Tabasco, México.**

Clon\Suelo	Rango de lluvia (1793-1936 mm)									Rango de lluvia (1937-2085 mm)															
	Cambisol			Gleysol			Vertisol			Fluvisol			Cambisol			Gleysol			Vertisol			Fluvisol			
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
CP 72-2086	0	0	0	0	0	0	0	0	0	np	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MEX 68-P-23	0	0	0	0	10	0	0	20	0	np	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MEX 69-290	0	0	0	0	0	0	0	0	10	np	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MEX 79-431	0	10	0	0	0	0	0	0	0	np	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RD 75-11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	np	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

np = suelo fluvisol no presente en este rango de lluvia; 1, 2, 3 = número de repetición en cada condición.

debido a los costos de resiembra de las zonas afectadas, por la obligada obtención de material libre por medio de termoterapia o cultivo de tejidos, y por la selección de clones resistentes (Rott y Davis, 2000). Por ejemplo, la aparición de la escaldadura de la hoja en Louisiana, EE. UU. provocó la pérdida de clones prometedores que se encontraban en proceso de selección, lo que ha llevado a modificar las estrategias de mejora varietal (Hoy y Grisham, 1994).

Al considerar el reducido número de plantaciones detectadas positivas (4/105), la baja incidencia de tallos infectados por plantación y la ausencia de síntomas en las plantaciones muestreadas que corresponden a clones ubicados como tolerantes (Chávez, 2000), podría indicar que la bacteria se está expresando en forma latente, como describen Flores (1997), Tokeshi (1980) y Rott y Davis (2000). Por la detección de la bacteria aquí realizada y la baja proporción de plantaciones portadoras, es tiempo oportuno para tomar acciones de manejo integral de dicha enfermedad, como propusieron Fucikovsky (2002) y Ovalle (2012). En dicho manejo integral se debe contemplar la utilización de semilla sana proveniente de semilleros certificados libres de bacteria, o en su defecto aplicar tratamientos hidrotérmicos a semillas de 3 a 4 yemas (pretratamiento a 50 °C por 10 min, reposo por 8 a 12 h, y tratamiento a 51 °C por 1 h); en adición, habría que establecer prácticas de desinfección de las herramientas de corte y de la maquinaria agrícola empleada en la zafra de varios predios (Victoria *et al.*, 1995).

#### Aislamiento de *X. albilineans*

El síntoma “líneas de lápiz”, típico de la fase crónica de la enfermedad, a partir del cual se aisló la bacteria, se ilustra en la Figura 2a, y el cultivo de colonias bacterianas de *X. albilineans* visibles después de 7 d de incubación se ilustra en la Figura 2b. Tales colonias eran circulares, de 1 mm de diámetro, de bordes lisos y de color claro y no mucoides, tal

como las describen Alvez *et al.* (2011).

#### Identificación molecular de *X. albilineans*

El rADN obtenido de las colonias bacterianas se amplificó mediante PCR con los iniciadores 8F y 1492R. La visualización de los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa, mostró la amplificación de la región 16S rDNA. Un aislamiento de *X. albilineans* obtenido en 2014 en la región cañera de La Chontalpa, de plantas sintomáticas del clon EMEX00-21 del Banco de germoplasma del Campo Experimental Regional del CIDCA C. A., presentó máxima asociación con las secuencias (AB248364, AB248374, NR074403, X95918) de *X. albilineans* depositadas en el Gen Bank (Figura 3).

Este resultado confirma la presencia *X. albilineans* y la manifestación de la enfermedad escaldadura de la hoja en la zona cañera de La Chontalpa, Tabasco. De esta forma se prueba la hipótesis acerca de la presencia de este patógeno causante de la escaldadura de la hoja, y es el primer reporte de su presencia en Tabasco. Por ello conviene tomar las medidas de manejo antes descritas para evitar una mayor diseminación. Además, se recomienda efectuar estudios adicionales para determinar el nivel de virulencia y agresividad de las cepas de *X. albilineans*, para sustentar una alerta temprana destinada a proteger la industria de la caña de azúcar de la región.

#### CONCLUSIONES

Se confirmó la presencia de las bacterias *Xanthomonas albilineans*, agente causal de la escaldadura de la hoja, en infecciones latentes en los clones MEX 69-290, MEX 68-P-23 y MEX 79-431. Asimismo, su distribución se limitó a la parte sudoeste del área de estudio, con incidencia máxima de 20 %, en cuatro puntos de dispersión.



Figura 2. Hoja de caña de azúcar del clon EMEX00-21, en etapa de amacollamiento del banco de germoplasma del Campo Experimental Regional del CIDCA C. A., con síntoma de “línea de lápiz” (flecha color negro) (a); colonias bacterianas típicas de *X. albilineans* en medio de cultivo agar nutritivo (b).

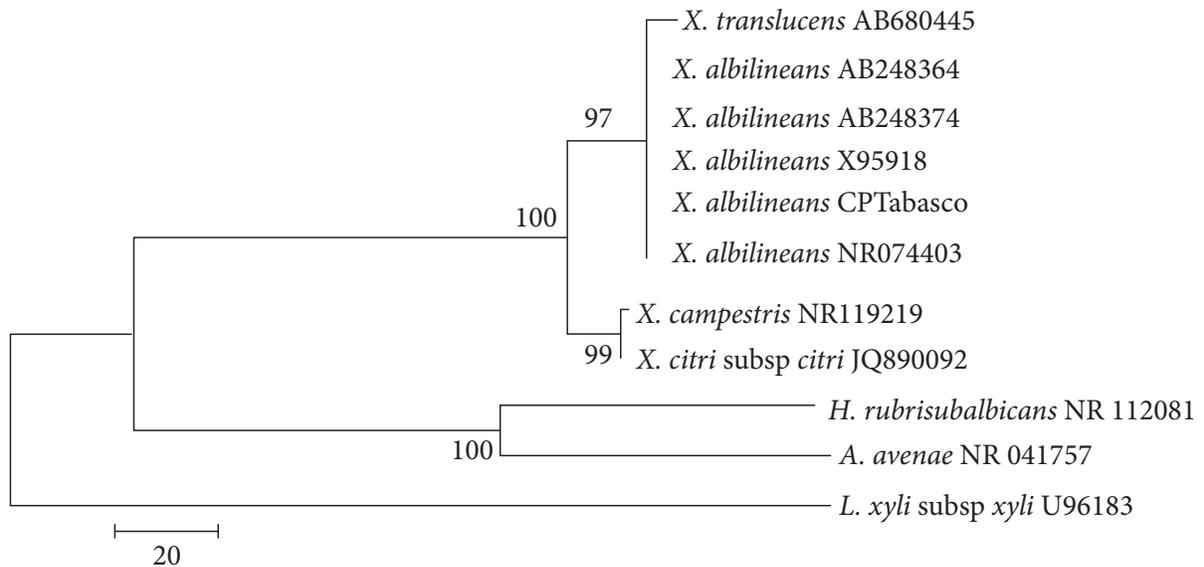


Figura 3. Dendrograma de similitudes construido con el método de Neighbour-joining con 1000 repeticiones tipo de arranque mediante el programa MEGA 6.05. En el árbol filogenético se contrasta la secuencia obtenida del aislamiento de Tabasco, contra la cepa de referencia y contra otras especies de *Xanthomonas* y otros patógenos bacterianos que afectan el cultivo de la caña de azúcar.

## AGRADECIMIENTOS

Al personal del Ingenio Presidente Benito Juárez y del Ingenio Santa Rosalía, por el apoyo brindado en la toma de muestras, en particular a los Ingenieros José Juan y José Gabriel García que nos acompañaron en la localización de las plantaciones comerciales seleccionadas, así como al CONACYT y a la línea de investigación LPI2 del Colegio de Postgraduados por el apoyo económico otorgado.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alvez B., J. Carballo, G. Alonso y M. Oropeza (2011) Diagnóstico molecular de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson en Venezuela, agente causal de la escaldadura foliar de la caña de azúcar. *Agronomía Tropical* 61:27-36.
- Badii M. H., A. Guillen, E. Cerna y J. Landeros (2011) Dispersión espacial: El prerrequisito esencial para el muestreo. *International Journal of Good Conscience* 6:40-71.
- Besosa T. R. y P. D. Estrada A. (2011) Evaluación de variedades promisorias en el Ingenio Presidente Benito Juárez. In: Memoria del 33 convención ATAM. Boca del Río, Veracruz. 20-23 septiembre. Ed. ATAM. Veracruz. 11 p.
- Chávez M. R. (2000) Resistencia varietal a la enfermedad de escaldadura de la caña de azúcar (*Xanthomonas albilineans*). In: Proyecto para Determinar la Resistencia Varietal al Mosaico, la Roya, el Carbón y la Escaldadura de la Hoja. F. Ayala G., R. Marín S., J. Juárez L., A. Valdez B., R. Chávez M., A. Ojeda R., C. Flores R. y S. Flores C. (comps.). Programa Nacional de Variedades del FOCYTCAÑA. México D. F. 84 p.
- Deán J. L. (1974) A method for isolating *Xanthomonas albilineans* from sugarcane leaves. *Plant Disease* 58:439-441.
- Doyle J. J. and J. L. Doyle (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Flores C. S. (1997) Enfermedades causadas por bacterias. In: Las Enfermedades de la Caña de Azúcar en México. C. Gómez-Núñez (ed.). Córdoba, Veracruz, México. pp:177-183.
- Fucikovsky L. (2002) Sugarcane (*Saccharum officinarum* L., *S. barberi* Jesurwiet, *S. sinense* Roxb and *S. edule* Hassk). In: Disease of Some Tropical and Subtropical Plants Caused by Bacteria, Phytoplasmas and Spiroplasmas. Ed. Universidad de Guadalajara-Colegio de Postgraduados. pp:49-63.
- González-Jiménez V., A. Valdez, F. C. Gómez, H. Silva, J. Pérez y C. F. Ortiz-García (2011) Caracterización molecular de variedades de caña de azúcar cultivadas en el estado de Tabasco, México. *Biotecnología Vegetal* 11:107-113.
- Hall T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Harrison N. A. and M. J. Davis (1988) Colonization of vascular tissues by *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* in stalks of sugarcane cultivars differing in susceptibility to ratoon stunting disease. *Journal of Phytopathology* 78:722-727.
- Hoy J. W. and M. P. Grisham (1994) Sugarcane leaf scald distribution, symptomatology, and effect on yield in Louisiana. *Plant Disease* 78:1083-1087.
- Huerta M. A., L. D. Ortega, S. C. Landeros, L. Fucikovsky y G. M. Marín (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.
- INFOCAÑA (2014) Lista de boletines del Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar: Zafra azucarera 2013-2014. [http://www.infocana.gob.mx/lista\\_boletines.php?t=1](http://www.infocana.gob.mx/lista_boletines.php?t=1). (Septiembre 2014).
- Irvine J. E., J. M. Amador, M. I. Gallo, M. Riess and J. C. Comstock (1993) First report of leaf scald, caused by *Xanthomonas albilineans*, of sugarcane in Mexico. *Plant Disease* 77:846.
- Janda J. M. and L. Abbott (2007) 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology* 45:2761-2764.
- Ovalle W. (2012) Enfermedades de la caña de azúcar. In: El Cultivo de la Caña de Azúcar en Guatemala. M. Melgar, A. Meneses, H. Orozco, O. Pérez y R. Espinosa. (eds.). Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar-Artemis Edinter. Guatemala, C. A. pp:233-258.
- Ovalle W. y S. García (2010) Incidencia de patógenos en semilleros de caña de azúcar en la zafra 2009-2010. In: Memoria de Presentación de Resultados de Investigación 2009-2010. M. Melgar (ed.). Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar. Guatemala. pp:127-132.
- Ricaud C. and C. Ryan (1989) Leaf scald. In: Diseases of Sugarcane. Major Diseases. C. Ricaud, B. T. Egan, Gillaspie Jr. C. and G. Hughes (eds.). Amsterdam, Netherlands. Elsevier Science Publishers. pp:39-58.
- Rott P. and M. J. Davis (2000) Leaf scald. In: A Guide to Sugarcane Diseases. P. Rott, R. A. Bailey, J. C. Comstock, B. J. Croft and A. S. Saumtally (eds.). CIRAD and ISSCT. Montpellier, France. pp:38-44.
- Saitou N. and Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Salgado S., D. Palma, J. Zavala, L. Lagunés, M. Castelán, C. Ortiz, J. Juárez, L. Armida y J. Rincón (2009) Sistema Integrado para Recomendar Dosis de Fertilizantes en Caña de azúcar (SIRDF): Ingenio Presidente Benito Juárez. Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. H. Cárdenas, Tabasco, México. 81 p.
- Taylor L. R. (1984) Assessing and interpreting the spatial distributions of insect populations. *Annual Review Entomology* 29:321-257.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipsky A. and S. Kumar S. (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.05. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729.
- Tokeshi H. (1980) Enfermedades de la caña de azúcar. In: Manual de Patología Vegetal; Enfermedades de las Plantas Cultivadas. Vol. II. F. Galli, P. Carvalho, H. Tokeshi, E. Balmer, H. Kimati, C. Cardoso, C. Salgado, T. Krugner, T. L. Cardoso y E. J. Bergamin (eds.). Ed. Agronómica Ceres. São Paulo, Brasil. pp:141-206.
- Victoria J. I., M. L. Guzmán y J. C. Ángel (1995) Enfermedades de la caña de azúcar en Colombia. In: El Cultivo de la Caña de Azúcar en Colombia. Ed. CENICANA. Cali, Colombia. pp:265-293.
- Zhang Z., S. Schwartz, L. Wagner and W. Miller (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7:203-214.