

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

RESPUESTA DE 41 VARIEDADES PROMETEDORAS DE CAÑA DE AZÚCAR A LA
ENFERMEDAD DE LA ESCALDADURA DE LA HOJA (*Xanthomonas albilineans*)

PRESENTA

JOSÉ DE JESÚS LÓPEZ VÁZQUEZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO

2013

La presente tesis, titulada: “**Respuesta de 41 variedades prometedoras de caña de azúcar a la enfermedad de la escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans*)**”, realizado por el alumno: José de Jesús López Vázquez, bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Apolonio Valdez Balero

ASESOR



Dra. Nydia Del Rivero Bautista

ASESOR



Dra. Hilda Victoria Silva Rojas

H. Cárdenas, Tabasco, 30 de mayo de 2013

DEDICATORIA

A Dios todo poderoso por guiarme en todos los aspectos de la vida.

Familia

A mi esposa Dora Alicia, mi hija Dora Alejandra, y la más pequeña Judith de los Ángeles, por permitirme robarles su tiempo, para cumplir con esta meta que hoy hago realidad.

A mis padres:

Fernando López García y Carmen Vázquez Pérez por todo su amor, su esfuerzo constante durante mi formación de estudiante, su comprensión, su ayuda y apoyo incondicional, por creer en mi cada momento en esta gran etapa de mi vida.

A mis Hermanos y familiares

Pascual, Ana María, Armando, Araceli, mis abuelos Pascual y María; mis tíos (as) Armando López, Rosa Velasco y María López García⁺ por su gran amistad y por formar parte de mi vida y por compartir conmigo tantos buenos momentos y malos momentos.

A mis amigos Roberto Loyo Joachin y José Manuel Pérez Ovando

Gracias por su amistad, por su confianza, consejos, y actos llenos de sinceridad, por cada uno de los momentos compartidos, espero y siempre seamos amigos.

A mis compañeros de generación 2011–2012.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico aportado durante mis dos años de maestría.

Al Colegio de Postgraduados Campus Tabasco por permitirme realizar mi maestría en el programa de Producción Agroalimentaria en el Trópico (PROPAT).

Al Dr. Carlos Flores Revilla Director del Centro de Investigación y Desarrollo de la Caña de Azúcar (CIDCA), por su ayuda y colaboración para el envío de las variedades de caña de azúcar para su evaluación.

Al Dr. Apolonio Valdez Balero, por la asesoría en mi trabajo de tesis, por sus conocimientos aportados, paciencia y apoyo incondicional.

Al Dr. Julián Pérez Flores por sus aportaciones, comentarios en la revisión de la tesis.

A los integrantes de mi consejo particular: Dr. Apolonio Valdez Balero, Dra. Nydia Del Rivero Bautista y Hilda Victoria Silva Rojas, por sus aportaciones en la realización de mi tesis.

Al personal de Laboratorio de Biotecnología y Fitopatología de Semillas. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, por los apoyos brindados durante mi formación académica.

Al personal Académico, de Laboratorio, Administrativo y de campo del Campus Tabasco, por las facilidades y apoyo brindado durante mis estudios.

A la imprenta creativos (Cristian, May y Tilo); por los apoyos en las impresiones y empastados de la tesis.

INDICE GENERAL

1 INTRODUCCIÓN	1
2 REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Origen y distribución geográfica de la escaldadura de la hoja	5
2.3 Agente causal, taxonomía y nomenclatura.....	5
2.3 Caracterización y diversidad de <i>Xanthomonas albilineans</i>	6
2.4 Síntomas de la enfermedad	7
2.4.1 Síntomas externos y las fases	7
2.4.2 Fase eclipse.....	7
2.4.3 Fase latente	7
2.4.4 Fase crónica	8
2.4.5 Fase aguda.....	9
2.5 Síntomas internos	9
2.6 Diagnóstico de la escaldadura de la hoja en caña de azúcar	10
2.6.1 Diagnóstico serológico.....	10
2.6.2 Diagnóstico molecular.....	11
2.7 Patogenicidad	12
2.8 Aislamiento.....	12
2.9 Plantas hospederas	13
2.10 Transmisión	13
2.11 Desarrollo de la enfermedad.....	15
2.12 Métodos de control	16

2.13 Importancia económica de la enfermedad de la escaldadura de la hoja en caña de azúcar.....	17
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1 Localización	18
3.2 Material vegetativo	18
3.3 Preparación del terreno.....	19
3.4 Diseño experimental.....	19
3.5 Selección de muestras y aislamiento del patógeno <i>X. albilineans</i>	19
3.6 Caracterización molecular del agente causal de la escaldadura de la hoja mediante la técnica de PCR.....	20
3.7 Preparación del inóculo.....	21
3.8 Evaluación de métodos de inoculación	22
4 RESULTADOS	26
4.1 Selección de muestras y aislamiento del patógeno <i>X. albilineans</i> causante de la enfermedad de la escaldadura de la hoja	26
4.2 Aislamiento de la bacteria <i>X. Albilineans</i>	27
4.3 Caracterización molecular del agente causal de la escaldadura de la hoja mediante la técnica de PCR.....	29
4.4 Evaluación de los métodos de inoculación para determinar la incidencia y la severidad de la escaldadura de la hoja en las variedades de caña de azúcar evaluadas.....	31
5 CONCLUSIÓN	39
6 RECOMENDACIONES	40
7. BIBLIOGRAFÍA.....	41
8. ANEXOS.....	50

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Variedades de caña de azúcar utilizadas en la evaluación de la escaldadura de la hoja	18
Cuadro 2. Escala de evaluación para determinar la reacción a la enfermedad de la escaldadura de la hoja para las variedades de caña de azúcar en estudio	25
Cuadro 3. Resultados del análisis de la secuenciación	30
Cuadro 4. Porcentaje de incidencia de 41 variedades de caña de azúcar a la enfermedad de la escaldadura de la hoja de la caña de azúcar	34
Cuadro 5. Porcentaje de severidad y reacción a la enfermedad de la escaldadura de la hoja de variedades de caña de azúcar evaluadas	35

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Regiones cañeras en México (PRONAC, 2007)	1
Figura 2. Fase eclipse de <i>X. albilineans</i> en caña de azúcar	7
Figura 3. Fase latente de <i>X. albilineans</i> en caña de azúcar	8
Figura 4. Fase crónica de <i>X. albilineans</i> en caña de azúcar. a) Rayas cloróticas en hojas. b) Emisión de yemas con síntomas de la enfermedad	8
Figura 5. Fase aguda de <i>X. albilineans</i> en caña de azúcar	9
Figura 6. Síntomas internos causado por <i>X. albilineans</i> en tallos de caña de azúcar	9
Figura 7. Representación esquemática de la dispersión natural de <i>X. albilineans</i> y la infestación subsecuente en plantas sanas de caña de azúcar	14
Figura 8. Ciclo de infección de la escaldadura de la hoja en caña de azúcar	16
Figura 9. Método de inoculación por transmisión mecánica a los cuatro meses de edad. a) Inóculo al 9×10^8 cfu/ml. b) aplicación del inóculo	22
Figura 10. Método de inoculación por inyección en las variedades de caña de azúcar evaluadas a los cuatro meses de edad	23
Figura 11. Método de inoculación por decapitado a los cuatro meses de edad. a) corte de punta del tallo. b) Aplicación del inóculo en los tallos decapitado	24
Figura 12. a) Síntomas externos de la escaldadura de la hoja en caña de azúcar en fase eclipse en la variedad MEX 79-431	26
Figura 12. b) Síntomas externos de la escaldadura de la hoja en caña de azúcar en fase crónica en la variedad CP 72-2086	26
Figura 13. Aislamiento de colonias de la bacteria <i>X. albilineans</i> sembradas en el medio de cultivo NBY	28
Figura 14. Colonias puras de <i>X. albilineans</i> cultivadas en medio de cultivo B de King	28
Figura 15. Amplificación de la banda correspondiente al gen 16S rRNA de ~1,500 bp	29
Figura 16. Métodos de inoculación para determinar el porcentaje de incidencia del patógeno causante de la enfermedad de la escaldadura de la hoja	32
Figura 17. Métodos de inoculación para determinar el porcentaje de severidad del patógeno causante de la enfermedad de la escaldadura de la hoja	33

Figura 18. Síntomas externos en fase eclipse en las variedades evaluadas	
Figura 19. Síntomas internos en fase latente	36
Figura 20. Síntomas de la fase aguda de la escaldadura de la hoja en caña de azúcar variedad EMEX00-21	37
Figura 21. Síntoma de la escaldadura de la hoja en fase crónica en la variedad YZ 84-7	37
	38

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Amplificación por PCR del ADN ribosomal (16S)	50
Anexo 2. Preparación de gel agarosa	50
Anexo 3. Análisis de Varianza evaluando incidencia con los 3 métodos de inoculación	51
Anexo 4. Prueba de Tukey evaluando incidencia evaluando con los 3 métodos de inoculación	52
Anexo 5. Comparación de medias entre tratamientos evaluado incidencia utilizando Tukey ($\geq p0.05$)	52
Anexo 6 Análisis de Varianza evaluando severidad con los 3 métodos de inoculación	53
Anexo 7. Prueba de Tukey evaluando severidad evaluando con los 3 métodos de inoculación	53
Anexo 8. Comparación de medias entre tratamientos evaluado incidencia utilizando Tukey ($\geq p0.05$)	54
Anexo 9. Análisis de Varianza evaluando incidencia con el método de decapitado	54
Anexo 10. Análisis de Varianza evaluando severidad con el método de decapitado	54

RESPUESTA DE 41 VARIEDADES PROMETEDORAS DE CAÑA DE AZÚCAR A LA ENFERMEDAD DE LA ESCALDADURA DE LA HOJA (*Xanthomonas albilineans*)

RESUMEN

José de Jesús López Vázquez, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2013

La escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans*), es una de las enfermedades bacterianas de mayor importancia en el cultivo de caña de azúcar. Afecta la calidad del jugo y en variedades susceptibles ocasiona pérdidas estimadas entre el 90 y 100%. Con el objetivo fue caracterizar molecularmente el agente causal, evaluar el método apropiado de inoculación y evaluar la respuesta de 41 variedades de caña de azúcar a la escaldadura de la hoja. Las variedades fueron inoculadas en campo por tres métodos: transmisión mecánica, inyección y decapitado; a los 120 días después de la siembra. Se empleó una suspensión bacteriana de 9×10^8 ufc/ml⁻¹. Para identificar molecular se utilizó PCR con los primers 8F y 1492R. Para determinar el método apropiado de inoculación se evaluó la incidencia y severidad. La incidencia se determinó por el número de tallos enfermos con relación al total de la población. La severidad se determinó de acuerdo a la escala propuestas por Chávez 2006. De acuerdo con el promedio de severidad de las plantas enfermas y a la población de la variedad se determinó el porcentaje promedio de severidad por tratamiento. El agente causal de la escaldadura de la hoja se encontró un 99% identidad de *Xanthomonas albilineans*. La mayor incidencia (35.67%) se presentó en la variedad COLPOSCTMEX 05-51 con respecto al resto de los tratamientos evaluados y la variedad YZ 84-7 (33%) presentó mayor severidad clasificando como altamente susceptible, mientras que las variedades CP 87-1233, MEX 02-16, SP 74-5203, CP 89-2143, EMEX 00-62, MEX 95-3 y MEX 94-192 no mostraron síntomas típicos de la enfermedad de la escaldadura de la hoja. Se concluye que el agente causal es *Xanthomonas albilineans*, el método apropiado de inoculación es el decapitado y se encontró a siete variedades que resultaron resistentes con 0% de incidencia y 0% de severidad.

Palabras Clave: Escaldadura, incidencia, severidad, resistencia y susceptibilidad.

**RESPONSE 41 PROMISING VARIETIES SUGAR TO DISEASE LEAF SCALD
(*Xanthomonas albilineans*).**

ABSTRACT

José de Jesús López Vázquez, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2013

The leaf scald (*Xanthomonas albilineans*), is one of the most important bacterial diseases in the cultivation of sugarcane. It affects juice quality and susceptible varieties causes losses estimated between 90 and 100%. With the aim was to characterize molecularly the causative agent, assess the appropriate method of inoculation, and evaluate the response of 41 varieties of sugarcane leaf scald. The varieties were inoculated in the field by three methods: mechanical transmission, injection and beheaded at 120 days after planting. We used a bacterial suspension of 9×10^8 ufc/ml-1. To identify molecular PCR was used with primers 8F and 1492R. To determine the appropriate method of inoculation was evaluated the incidence and severity. The incidence was determined by the number of diseased stems in relation to the total population. The severity was determined according to the scale proposed by Chavez 2006. According to the average severity of diseased plants and people of the variety was determined the average percentage of severity per treatment. The causal agent of leaf scald found 99% identity *Xanthomonas albilineans*. The highest incidence (35.67%) occurred in the range 05-51 COLPOSCTMEX from the rest of the treatments evaluated and variety YZ 84-7 (33%) had greater severity classified as highly susceptible, while varieties CP 87 - 1233, MEX 02-16, SP 74-5203, CP 89-2143, EMEX 00-62, 95-3 and MEX 94-192 showed no typical symptoms of the disease of leaf scald. We conclude that the causative agent is *Xanthomonas albilineans*, the appropriate method of inoculation is beheaded and found seven varieties that were resistant to 0% 0% incidence and severity.

Keywords: Scald, incidence, severity, resistance and susceptibility.

1 INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar (*Saccharum* spp.) es uno de los principales cultivos de importancia económica en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Chastel, 1994). Se cultiva en más de 130 países, siendo Brasil el mayor productor con un aporte del 28% del total de la producción, seguido por la India, China, Tailandia, México y Pakistán (USDA, 2010). México ocupa el quinto lugar a nivel mundial con 786,539 hectáreas sembradas y una producción de 51, 304,319 toneladas con un rendimiento promedio nacional de 69.661 t.ha⁻¹(SIAP, 2012).

La agroindustria de la caña de azúcar se divide en cinco regiones que abarcan 15 estados y 240 municipios (Figura 1). Estas regiones son: Región Noroeste (Sinaloa), Región Pacífico (Nayarit, Colima, Jalisco y Michoacán), Región Centro (Morelos y Puebla), Región Noreste (Tamaulipas y San Luis Potosí), Región Golfo (Veracruz, Tabasco y Oaxaca) y Región Sureste (Campeche, Chiapas y Quintana Roo).



Figura 1. Regiones cañeras en México (PRONAC, 2007).

La producción de azúcar en México depende de tres elementos fundamentales: la cantidad y calidad de la caña industrializada, el rendimiento en fábrica y la capacidad instalada y aprovechada de los ingenios azucareros (Hernández, 2006). Para el subsistema campo, el rendimiento de caña de azúcar ($t\cdot ha^{-1}$) es el parámetro clave y es muy importante en relación con la disponibilidad de materia prima para la fábrica. El azúcar y el contenido de fibra en la caña dependen de una serie de factores, entre ellos; la variedad, la cantidad y disponibilidad de agua, la calidad y oportunidad en la aplicación de fertilizantes y productos agroquímicos, el tipo de suelo utilizado para el cultivo, las prácticas de cultivo, las condiciones climáticas durante el cultivo, el control de plagas y enfermedades. Estos, junto al rendimiento agroindustrial, son los indicadores de la eficiencia en el cultivo de la caña de azúcar (ISO, 2005).

El cultivo de la caña de azúcar es afectado por diferentes factores abióticos como la inadecuada fertilidad del suelo, el mal drenaje, la toxicidad por productos químicos y la sequía, entre otros; así como, por agentes bióticos como hongos, bacterias, virus, fitoplasmas y nemátodos; estos agentes pueden afectar considerablemente la productividad del cultivo si no se realiza un manejo preventivo adecuado (Juárez y Valdez, 2000).

Los principales problemas fitopatológicos asociados al cultivo de la caña de azúcar son el raquitismo causado por *Clavibacter xyli*, el síndrome de la hoja amarilla causado por el virus *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV), la escaldadura de la hoja causada por la bacteria *Xanthomonas albilineans*, la roya café causada por *Puccinia melanocephala* H. Sydow y P. Sydow, la roya naranja causada por *Puccinia kuehnii*, el carbón causado por *Sporisorium scitamineum* M. Piependr; M. Stoll y Oberwinkler F. y el virus del mosaico común causado por el virus *Sugarcane mosaic virus* ScMV (Victoria et al., 1995, Victoria et al., 1997). Todas estas enfermedades han sido clasificadas como económicamente limitantes en variedades susceptibles.

Los productores cañeros mexicanos en los últimos 40 años utilizaron variedades generadas y seleccionadas por el Instituto para el Mejoramiento de la Producción de Azúcar (IMPA). Sin embargo, desde el cierre de esta institución la liberación de nuevas variedades comerciales ha sido escasa o nula en el país (Juárez y Valdez, 2000). Las últimas evaluaciones para detectar mosaico, roya, carbón y escaldadura de la hoja, se realizaron durante el período comprendido de 1998 al 2000 a través de convenios con el Programa Nacional de Investigación en Ciencia y Tecnología de la Agroindustria de la Caña de Azúcar (CYTCAÑA) y la Cámara de las Industrias Azucarera y Alcoholera (CNIAA).

La escaldadura de la hoja, es una de las enfermedades de mayor importancia en el cultivo por sus efectos sobre el rendimiento agrícola, la calidad del jugo y las elevadas pérdidas que ocasiona en su fase aguda, estimadas entre el 90 y 100% (Ricaud y Ryan, 1989; Hoy y Grisham, 1994). En las variedades moderadamente susceptibles ocasionan pérdidas en los rendimientos de campo que pueden llegar hasta el 15%, afectando los grados brix y la concentración de sacarosa (Flores 1997; Rott *et al.*, 1997; Lopes *et al.*, 2001, Iglesia *et al.*, 2003; Huerta, 2000 y 2004).

Esta enfermedad está presente en los países productores de caña (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. Posteriormente fue observada en la variedad SP 70-1284 en Tres Valles, Veracruz (Irvine *et al.*, 1993). Los últimos muestreos realizados por Valdez (2010) en los ingenios Santa Rosalía y Benito Juárez en el Estado de Tabasco, indicaron que la enfermedad estaba presente 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 enfermedad en diferentes regiones del mundo. No obstante, el uso de variedades resistentes constituye el mejor método de control de la enfermedad. Según Rott *et al.* (1995) la incidencia de la escaldadura logró disminuirse considerablemente en Australia y la Isla de Guadalupe con la introducción de variedades resistentes. Debido a lo anterior, el presente trabajo de investigación planeó evaluar la respuesta de 41 variedades de caña de azúcar en fases avanzadas de selección para conocer la respuesta de estas variedades a la escaldadura de la hoja. El conocimiento de las variedades resistentes a la enfermedad en la región sureste proporcionará una alternativa para contar con material vegetativo para su propagación.

Teniendo en cuenta lo anterior se planteó la siguiente hipótesis de trabajo.

Hipótesis

Todas las variedades a evaluar son resistentes a la enfermedad de la escaldadura de la hoja causada por *Xanthomonas albilineans*.

Para demostrar esta hipótesis, se propusieron los siguientes objetivos de trabajo:

Objetivo General

Evaluar la respuesta de variedades de caña de azúcar en fases de selección avanzada, a la enfermedad de la escaldadura de la hoja.

Objetivos específicos

- 1.-Aislar el agente causal *Xanthomonas albilineans* que causa la enfermedad escaldadura de la hoja
- 2.-Caracterizar molecularmente al agente causal de la escaldadura de la hoja.
- 3.-Determinar el método de inoculación más apropiado para evaluar la incidencia y severidad de la escaldadura de la hoja en las variedades de caña de azúcar.
- 4.-Evaluar la respuesta de 41 variedades de caña de azúcar a la enfermedad de la escaldadura de la hoja.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Origen y distribución geográfica de la escaldadura de la hoja

La escaldadura foliar de la caña de azúcar, es una enfermedad bacteriana vascular ocasionada por *X. albilineans* (Ashby) Dowson, se registró por primera vez en 1911, en Australia (Martin y Robinson, 1961), aunque existieron evidencias de su presencia en las islas Fiji en 1908.

La enfermedad apareció en todos los continentes productores de caña de azúcar; en países como África del Sur, Australia, Brasil, Estados Unidos, Guadalupe, India, Islas Reunión y en Papúa Nueva Guinea como una de las principales enfermedades que afectan la producción cañera en esos territorios (Alexander *et al.*, 1996; Bailey *et al.*, 1996; Comstock *et al.*, 1996; Croft *et al.*, 1996; Rott *et al.*, 1996; Suma *et al.*, 1996; Rott y Davis, 2000). Los mismos autores refirieron que la escaldadura se ha identificado en 65 zonas geográficas.

2.2 Agente causal, taxonomía y nomenclatura

El agente causal de la enfermedad de la escaldadura de la hoja en caña de azúcar, fue identificado en Java por Wilbrink (1920) y en Australia y Fiji por North

(1926). Según la clasificación vigente de los seres vivos (Woese *et al.*, 1990; Maidak *et al.*, 1999), el dominio Bacteria está dividido en 13 grupos, clasificados como reinos (Madigan *et al.*, 2000). Holt *et al.* (1994) señalan que el reino IV (Proteobacteria), contiene un gran número de bacilos y cocos Gram negativos y engloba a la mayoría de las bacterias fitopatógenas. Dentro de este reino, el orden 1 (*Pseudomonadales*), familia 4 (*Pseudomonadaceae*), contiene el género *Xanthomonas* (Cório da Luz, 2000).

Según Domrachev *et al.* (2003) la clasificación taxonómica es:

Orden: *Xanthomadales*

Familia: grupos de las *Xanthomonas*

Género: *Xanthomonas*

Especie *X. albilineans*

Vauterin *et al.*, 2000; Vauterin y Swings, 1997 y Dowson en 1943 confirmaron que las bacterias pigmentadas de amarillo, patógenas a plantas y con un simple flagelo polar fueron agrupadas en el género *Xanthomonas*. La nomenclatura del patógeno de la escaldadura de la hoja caña en azúcar se ha mantenido con el nombre de *X. albilineans*.

2.3 Caracterización y diversidad de *Xanthomonas albilineans*

La bacteria pertenece al género *Xanthomonas* de la especie *albilineans* Van Den Mooter y Swings (1990) señalan que existe una gran heterogeneidad entre los diferentes aislamientos que se han realizado de esta bacteria. Otros autores como Rott (1995) menciona que en la identificación existen diferentes formas de variación en las características como la morfología de las colonias y células bacterianas, las proteínas totales de la pared celular, los esteroides metílicos de los ácidos, la reacción ante bacteriófagos, la reacción serológica y la diversidad genómica.

2.4 Síntomas de la enfermedad

2.4.1 Síntomas externos y fases

Dentro de los síntomas externos que muestran las plantas infectadas por la enfermedad se presentan cuatro fases diferenciadas; fase eclipse, fase latente, fase crónica y fase aguda, las características de estas fases han sido descritas detalladamente por autores como Bisessar (1965); Ricaud y Ryan (1989); Agnihotri (1990); Rott *et al.* (1995); Davis (1997); Rott *et al.* (1997); Flores (1997); Huerta (2000, 2004).

2.4.2 Fase eclipse

Autores como Bisessar (1965); Flores (1997) y Tokeshi (1997) refieren que esta fase se caracteriza porque aparecen y desaparecen rayas blancas foliares; en las hojas jóvenes no se observa ningún síntoma y una misma planta puede registrarse como enferma o sana, dependiendo del momento en que se realiza la evaluación de la enfermedad, (Figura 2).



Figura 2. Fase eclipse de *X. albilineans* en caña de azúcar

2.4.3 Fase latente

En esta fase la parte interna de los tallos maduros pueden mostrar una coloración rojiza en los haces fibrovasculares (Figura 3), 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 tolerantes (Bisessar, 1965; Ricaud y Ryan 1989; Agnihotri, 1990; Rott *et al.*, 1995, 1997; Davis, 1997; Flores, 1997; Huerta, 2000, 2004).



Figura 3. Fase latente de *X. albilineans* en caña de azúcar

2.4.4 Fase crónica

En esta fase de la enfermedad se presentan rayas blanquecinas, finas y bien definidas, se pueden observar una o varias de ellas y éstas se distribuyen en forma paralela a la nervadura de la hoja (Figura 4). Una sola cepa presenta a menudo tallos enfermos y sanos; los tallos enfermos detienen su crecimiento y pueden producir brotes laterales o "lalas, las cuales son generalmente cloróticas y no sobreviven al sembrarse (Bisessar, 1965; Ricaud y Ryan 1989; Agnihotri, 1990; Rott *et al.*, 1995, 1997; Davis 1997; Flores, 1997; Huerta, 2000, 2004).



Figura 4. Fase crónica de *X. albilineans* en caña de azúcar. **a)** Rayas cloróticas en hojas. **b)** Emisión de yemas con síntomas de la enfermedad

2.4.5 Fase aguda

La fase aguda se caracteriza por la muerte súbita de la planta sin mostrar síntomas crónicos, ésta generalmente sigue cuando se presentan condiciones de tiempo seco, lo cual es favorable para el desarrollo del patógeno (Figura 5) (Bisessar, 1965; Agnihotri, 1990; Parra, 1993; Rott *et al.*, 1995; Davis 1997; Rott *et al.*, 1997, Flores, 1997; Huerta *et al* 2003; Huerta, 2000, 2004).



Figura 5. Fase aguda de *X. albilineans* en caña de azúcar

2.5 Síntomas internos

La escaldadura de la hoja de la caña de azúcar, es una enfermedad que afecta el sistema vascular, debido a la colonización del patógeno en los vasos del xilema (Rott *et al.*, 1994; Flores, 1997; López *et al.*, 2001; Huerta *et al.*, 2003). En el corte longitudinal de un tallo afectado (Figura 6), se pueden observar los haces fibrovasculares de una coloración rojiza, especialmente en la región nodal y en los puntos de crecimiento (Bisessar, 1965).



Figura 6. Síntomas internos causado por *X. albilineans* en tallos de caña de azúcar.

2.6 Diagnóstico de la escaldadura de la hoja en caña de azúcar

Autores como Honeycutt *et al.* (1995); Pan *et al.* (1997,1999) mencionan que el diagnóstico de la enfermedad se basa principalmente en la observación de los síntomas visibles en campo, el aislamiento del patógeno (Davis *et al.*, 1994), la utilización de métodos serológicos (Rott *et al.*, 1986 y 1994) y métodos moleculares con el empleo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Davis *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999).

2.6.1 Diagnóstico serológico

Dentro de los métodos empleados para el diagnóstico, el método de análisis serológico se utiliza para determinar fitobacterias (Wu *et al.*, 1990; Comstock e Irey, 1992), incluyendo el género *Xanthomonas* (Álvarez y Lou, 1985; Benedict *et al.*, 1989). Autores como Rott *et al.* (1994) refieren que existe una gran variabilidad antigénica que ha sido detectada en *X. albilineans* y su efectividad puede ser afectada si no se utilizan antisueros que sean capaces de reaccionar con los serovares conocidos de la bacteria.

La bacteria *X. albilineans* se ha evaluado con diferentes técnicas, entre ellas la microaglutinación y la doble difusión en agar (IDD) (Ricaud y Ryan, 1989), la inmunofluorescencia directa (IFD) e indirecta (IFI) (Rott *et al.*, 1986, 1988). Autores como Comstock e Irey (1992); Ramallo *et al.* (1999) y Wang *et al.* (1999) han utilizado técnicas como ELISA (por sus siglas en inglés Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Mientras que, Davis *et al.* (1994) han empleado la aglutinación en látex y el TBIA (Tissue blot enzyme immunoassay por sus siglas en inglés), así como la utilización de antisueros y anticuerpos monoclonales para esta especie (Tsai *et al.*, 1990).

Comstock e Irey (1992) compararon los métodos de diagnóstico por TBIA, ELISA y el aislamiento *in vitro*, para detectar *X. albilineans* en diferentes posiciones del tallo

de caña de azúcar y determinaron que los mayores niveles de la bacteria se encuentra en el tercio superior del tallo, tanto en plantas sintomáticas como asintomáticas, en las cuales el nivel de la bacteria es bajo y su distribución desigual. Los mismos autores encontraron en sus resultados que el TBIA y el aislamiento de la bacteria fueron las técnicas más útiles y efectivas para la detección de *Xanthomonas albilineans* en infecciones latentes.

2.6.2 Diagnóstico molecular

Henson y French (1993) señalan que la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una herramienta de diagnóstico de bacterias fitopatógenas, se ha incrementado dada su rapidez, sensibilidad y especificidad (Manulis *et al.*, 1994; Mcmanus y Jones, 1995; Louws *et al.*, 1999). En el género *Xanthomonas* ha sido utilizada para la detección de *X. axonopodis* pv. *citri* (Hartung *et al.*, 1996), *X. campestris* pv. *phaseoli* (Audy *et al.*, 1996) y *X. axonopodis* pv. *Vesicatoria* (Leite *et al.*, 1995). Autores que utilizaron la técnica de PCR para la detección de *X. albilineans* han sido Honeycutt *et al.* (1995); Lopes (1996); Pan *et al.* (1997); Davis *et al.* (1995, 1998) y Wang *et al.* (1999).

Se han utilizado diferentes iniciadores mediante la técnica de PCR. Por ejemplo, Honeycutt *et al.* (1995), diseñaron el iniciador Ala4, el cual unido al Ile2 ácido ribonucleico de transferencia (tARN) o específico), permitieron amplificar un segmento de 70 pares de bases (bp) para el diagnóstico de *X. albilineans* en plantas enfermas y con infecciones latentes. Mientras que, Lopes y Damann (1996) sugirieron el uso de los iniciadores T3A y T5B. Por otra parte, Pan *et al.* (1997) propusieron la utilización de los iniciadores Ala4 empleados por Honeycutt *et al.* (1995) y L1 usados por Jensen *et al.* (1993), con lo que amplificaron un fragmento de 360 pb de la región Espacio Transcrito Interno del rRNA (ITS) y el DNA ribosomal 16S/23S en aislamientos representativos de los diferentes serovares. Sin embargo, fueron amplificados también tres fragmentos de 280, 240,

y 460 pb a partir de bacterias saprófitas no identificadas, comúnmente encontradas en el cultivo de la caña. Lo anterior, puede deberse al carácter universal del iniciador L1 y a la limitada especificidad del iniciador Ala4. Autores como Pant *et al.* (1999) a partir del clonaje y secuenciación del fragmento amplificado de 360 pb, diseñaron los iniciadores PGBL1 y PGBL2, altamente específicos para el diagnóstico de la bacteria.

2.7 Patogenicidad

Las característica típica de la bacteria *X. albilineans* es la producción de tóxicos llamada albicidina. La albicidina es la principal toxina, en las hojas provoca clorosis y se debe al bloqueo en la diferenciación de los cloroplastos, inhibe la replicación de Ácido Dextrorribonucleico (DNA) plastídico en las células del xilema invadidas por la bacteria.

Rott (1996) realizó un análisis de restricción agrupando al menos dos genes que codifican la síntesis de la albicidina, resultando un fragmento de 48 Kb altamente específico para *X. albilineans*, a partir de este estudio se diseñaron iniciadores para la identificación de esta especie mediante la técnica de PCR. Donde se determinó que los genes tenían una longitud de 69 Kb en el cromosoma bacteriano.

2.8 Aislamiento

Davis *et al.* (1994) mencionaron que en los medios de cultivo bacteriológicos para el aislamiento *in vitro* de *X. albilineans* se han tenido limitantes, debido a su lento crecimiento y exigencias nutricionales. Es por ello, que existen diversas metodologías a partir de exudados de la bacteria y macerados de tejidos (Ricaud y Ryan, 1989) siendo el más reciente, el propuesto por Davis *et al.* (1994) a partir del jugo del tallo colectado por centrifugación y posteriormente diluido en solución fosfato. De acuerdo con Palleroni y Bradbury (1993) el medio de cultivo Wilbrinx

(Wilbrinx, 1920) es el más utilizado para el aislamiento de la bacteria. La identificación está basada en las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas.

2.9 Plantas hospederas

La caña de azúcar es el principal hospedero natural. En muchos países se han detectado hospederos alternativos o secundarios del patógeno, tanto en infecciones naturales como artificiales. Entre estos se encuentran: *Bambusa vulgaris*, *Brachiaria piligera*, *Coix lacryma-jobi*, *Cymbopogon citratus*, *Imperata cylindrica*, *Panicum maximum*, *Paspalum dilatatum*, *P. conjugatum*, *P. commerconii*, *P. paniculatum*, *P. scrobiculatum*, *Pennisetum purpureum*, *Pennisetum sp.*, *Rottboellia cochinchinenses*, *Sorghum halepense*, *S. verticilliformum*, *Thysanolaena agrostis*, *T. máxima* y *Zea mays* (Rott *et al.*, 1988).

2.10 Transmisión

En las regiones cañeras del mundo la transmisión el agente causal de la escaldadura ocurre principalmente por la utilización de semillas infectadas, y la transmisión de un área a otra por el empleo de equipos y herramientas contaminadas como son machetes y las cuchillas de las cosechadoras, se ha comprobado que el patógeno puede sobrevivir hasta por seis días. Esquivel (1975) encontró que una vez contaminadas las herramientas la bacteria se transmite con relativa facilidad a tallos sanos. Además, las lluvias y vientos, también pueden constituirse en un agente efectivo de transmisión de la bacteria (Davis *et al.*, 1998) (Figura 7).

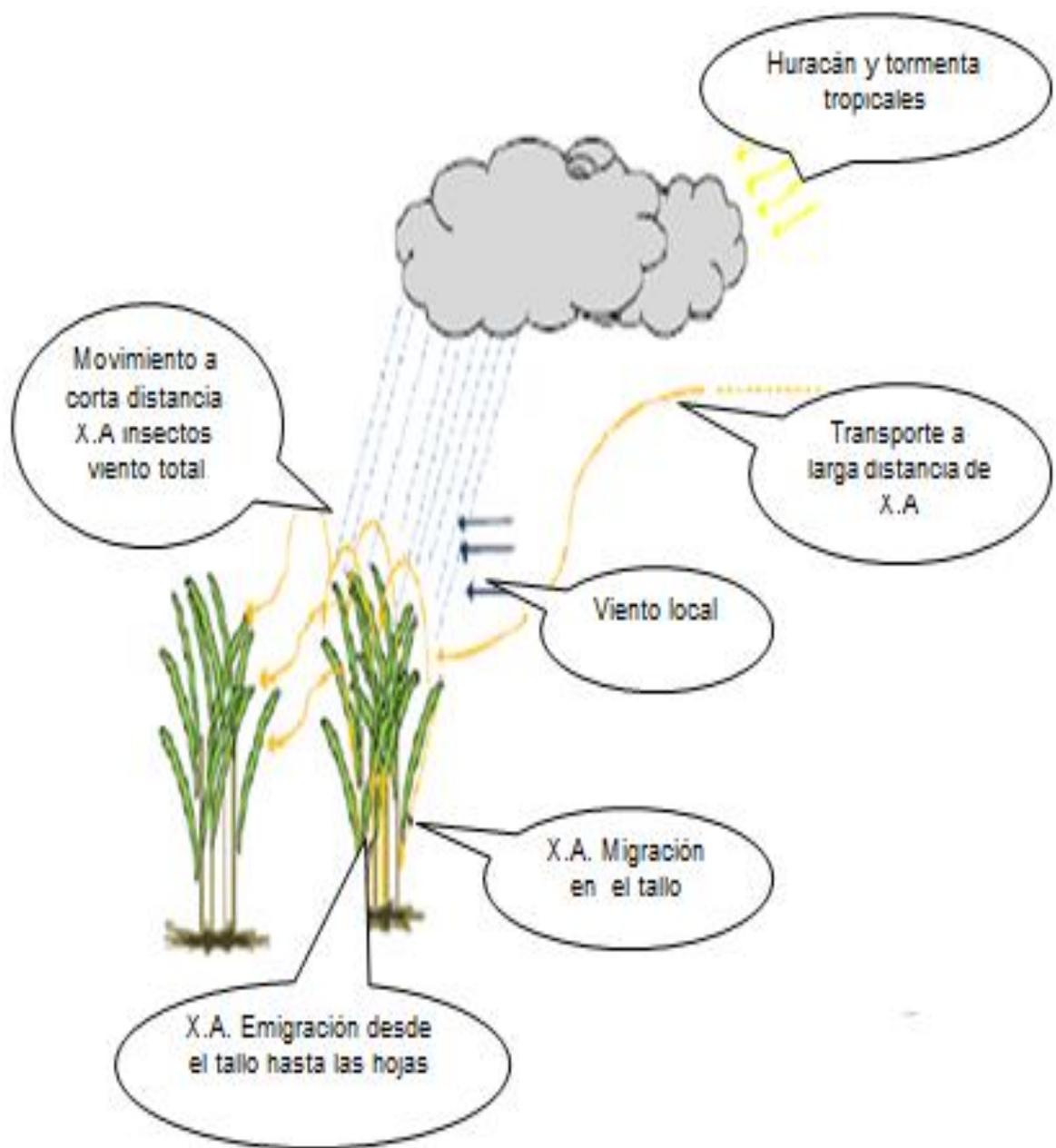


Figura 7. Representación esquemática de la dispersión natural de *Xanthomonas albilineans* y la infestación subsecuente en plantas sanas de caña de azúcar (Daugrois *et al.*, 2012).

2.11 Desarrollo de la enfermedad

Gatti de Almeida (2010) menciona que la escaldadura de la hoja en caña de azúcar presenta un crecimiento lento, lo cual torna difícil su aislamiento en el medio de cultivo. La bacteria se transporta por el xilema de la planta y en las variedades altamente susceptibles detiene su crecimiento. Los síntomas iniciales consisten en la aparición de brotes laterales que se caracterizan porque aparecen las rayas blancas en las hojas jóvenes; la parte interna de los tallos maduros puede mostrar una coloración rojiza de los haces fibrovasculares, especialmente en los nudos de los canutos y posteriormente en condiciones de tiempo seco, lo cual es favorable para el patógeno, que incrementa la severidad hasta ocasionar la muerte de la planta (Rott *et al.*, 2000).

El patógeno se disemina por el viento, el agua e implementos agrícolas. Además, el ambiente es un factor que influye fuertemente en la severidad de la enfermedad. Las condiciones óptimas para el desarrollo de la bacteria *X. albilineans* son temperaturas entre 25 a 28°C (Vauterin *et al.*, 1993). La enfermedad es más severa cuando se presentan temperaturas superiores a 34°C, con lluvias moderadas, en climas cálidos y con precipitación pluvial escalonada de 25 a 75 mm, se incrementa su intensidad y la mayor incidencia tanto en variedades susceptibles como resistentes, se presenta en los meses de mayo a julio en el país (Flores, 1997).

Birch (2011) refiere que la bacteria puede encontrarse en fase latente de infección y de esta manera, la planta puede ser considerada erróneamente como sana, pudiendo exhibir los síntomas cuando las condiciones ambientales se tornan favorables para su desarrollo. El ciclo de la enfermedad se presenta en la Figura 8

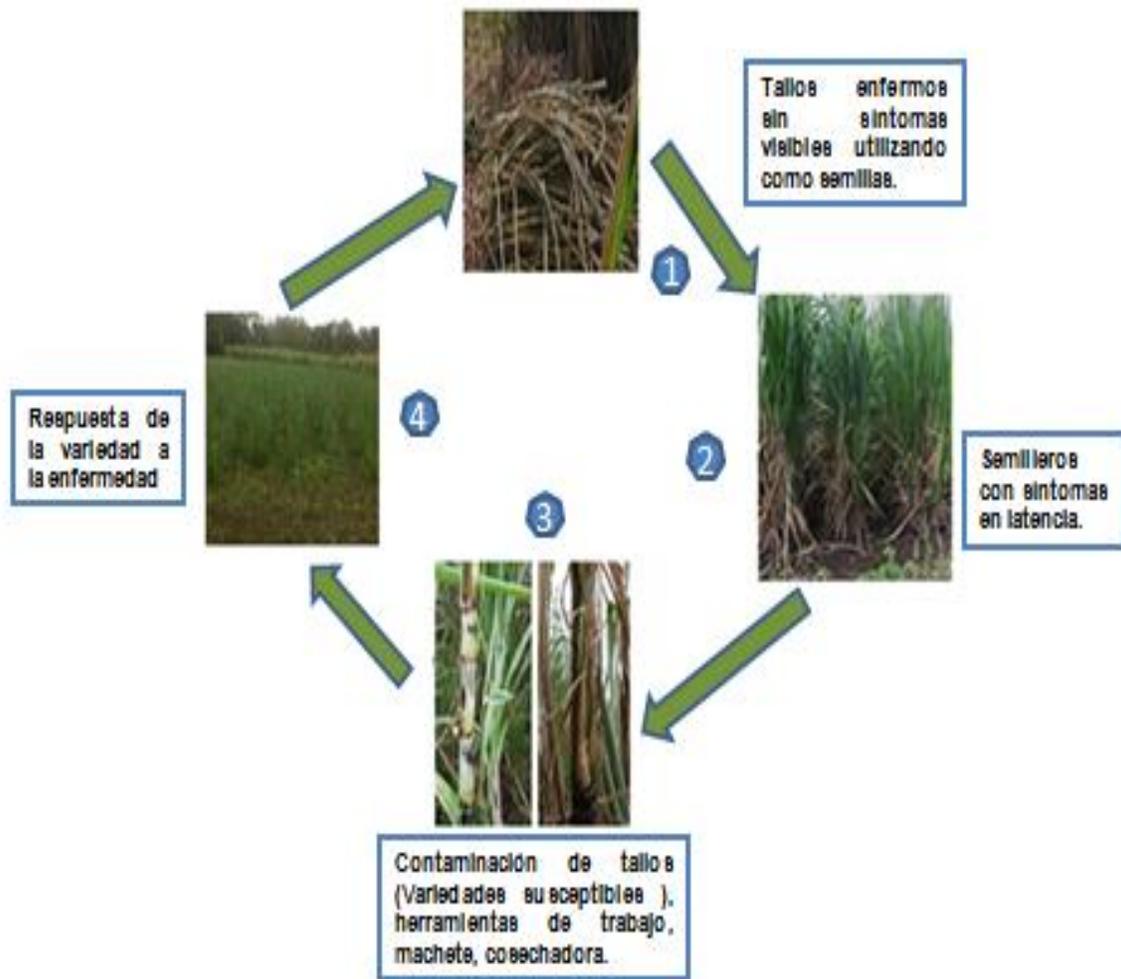


Figura 8. Ciclo de infección de la escaldadura de la hoja en caña de azúcar.

2.12 Métodos de control

China y Rodríguez (1994) señalan que el mejor método de control de la escaldadura de la hoja se efectúa con éxito con el empleo de variedades resistentes y una adecuada selección de material sano para la siembra, el entresaque de material enfermo de los semilleros y la desinfestación frecuente de la herramienta usada para el corte, empleando productos químicos como sanitizantes.

Otra alternativa para la obtención de variedades resistentes es la ingeniería genética mediante la obtención de plantas transgénicas. Zhang *et al.* (1999) obtuvieron plantas transgénicas de caña de azúcar que expresaban el gen (albD), con una capacidad de detoxificación equivalente a 1-10 ng de enzima/mg de proteína foliar, capaz de inhibir la manifestación de los síntomas, mientras que los controles no transformados desarrollaron síntomas foliares severos y se demostró que los aislamientos toxigénicos no se multiplican en las plantas transformadas, lo que construirá en el futuro una vía de obtención de variedades resistentes a la enfermedad.

2.13 Importancia económica de la enfermedad de la escaldadura de la hoja en caña de azúcar

La escaldadura afecta el rendimiento de campo, retrasa el crecimiento de los “pelillos” (retoños de socas), disminuye el número de tallos por cepa, y el desarrollo de los brotes. La producción disminuye, dependiendo del nivel de susceptibilidad de la variedad entre un 15 a 30%; en condiciones de sequía las pérdidas puede llegar hasta un 50 a 60 por ciento dependiendo de la susceptibilidad. La presencia de la bacteria en los tallos, afecta la calidad del jugo reduciendo el brix, el pol y la pureza (Rott, 1997).

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización

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), sus coordenadas son 17°59'10.20"N y 93°35'36.69" a 10 msnm. Las evaluaciones se realizaron de mayo de 2012 a noviembre de 2012.

3.2 Material vegetativo

Como material vegetativo se utilizaron 36 variedades de caña de azúcar que se encuentran en fases avanzadas de selección y cinco testigos (cuatro variedades susceptibles positivos y una variedad resistente negativo) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Variedades de caña de azúcar utilizadas en la evaluación de la escaldadura de la hoja

NUM	VARIEDAD	NUM	VARIEDAD
1	CP 94-1674	22	B 46-492
2	SP 83-5073	23	SP 80-1816
3	COLMEX 95-27	24	CXZ 75-644
4	COLMEX 94-8	25	COLPOS CT MEX 05-224
5	MEX 94-192	26	CP 90-1424
6	TCP 89-3493	27	MEX 02-16
7	YZ 84-7	28	COLPOS CT MEX 05-051
8	MEX 95-104	29	SP 72-4928
9	B78-266	30	SP 74-5203
10	MEX 95-60	31	CP 89-2143
11	MEX 96-19	32	LT MEX 94-2
12	SP 80-1815	33	LGM 92-65
13	L79-321	34	SP 71-6180
14	EMEX-0062	35	CP 87-1233
15	MEX 91-566	36	LT MEX 96-10
16	ITV 92-373	37	MEX 69-290 (t+)
17	ITV 92-1424	38	MEX 68 P 23(t+)
18	CP 80-1743	39	CP 72-2086(t+)
19	EMEX 0021	40	MEX 79-431 (t+)
20	MEX 95-3	41	CO 997 (t-)
21	MEX 95-52		t(+)=testigo positivo t(-)=testigo negativo

3.3 Preparación del terreno

La preparación del terreno consistió en: barbecho, rastra y surcado. Las labores de cultivo subsecuentes se realizaron de acuerdo a lo recomendado para la región. La fertilización se realizó con la fórmula comercial 120-60-60, 350 kg de 17-17-17 al momento de la siembra y 150 kg de urea al cierre de campo, según lo recomendado (Valdez *et al.*, 2009). El método de siembra empleado fue a cordón doble.

3.4 Diseño experimental

El experimento se estableció bajo un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones. La unidad experimental estuvo conformada por un surco de 10 m de largo. La distancia entre las variedades fue de 1.4 m entre surcos.

3.5 Selección de muestras y aislamiento del patógeno *X. albilineans*

En marzo del 2011 se realizó un muestreo en los campos cañeros del ingenio Benito Juárez, S. A. (Cárdenas, Tabasco). Se colectaron hojas, tallos, yemas y brotes de variedades (CP 72-2086, MEX 69-290, MEX 79-431 y MEX 68-P 23) que mostraron los síntomas de la enfermedad. Un total de 27 muestras fueron colectadas y utilizadas para el aislamiento del patógeno.

Las muestras se llevaron al Laboratorio de Cultivo de tejidos y se sumergieron en alcohol al 70% durante un minuto y se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril. Posteriormente, las muestras se maceraron hasta obtener el jugo; cada muestra obtuvo un volumen aproximado de 100 mililitros por muestra. Del jugo extraído se utilizó 1 ml, el cual fue diseminado uniformemente por toda la superficie del medio de cultivo con auxilio de una espátula de Drigalsky (se

cultivaron las 27 muestras). El medio de cultivo utilizado es el NBY (caldo nutriente-agar extracto de levadura). Las cajas Petri fueron incubadas a 28 °C hasta la aparición de las primeras colonias. Para purificar las colonias de la bacteria se utilizó el medio B de King desarrollado por Schaad (2001).

3.6 Caracterización molecular del agente causal de la escaldadura de la hoja mediante la técnica de PCR

La caracterización molecular se realizó utilizando los primers universales 8F (5'-AGTTGATCCTGGCTCAG- 3') y 1492R (5'-ACCTTGTTACGACTT- 3') para amplificar un segmento de 1500 pares de bases (bp) de DNA ribosomal del espacio transcrito entre el gen 16S rDNA (Sacchi *et al.*, 2002).

Extracción DNA

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%). De las colonias purificadas se tomaron 3 mm con la ayuda de la punta de una micropipeta (Tip) y para ello, se empleó un tubo Eppendorf de 1.5 ml de capacidad, al que se le añadieron 30 µL de buffer de Lisis (Tris HCl 100 mM pH, 20 mM Na₂EDTA 2H₂O, pH 8, 1.4 MNaCl, 2%, CTAB β-mercaptoetanol 0.2%); enseguida la mezcla se agitó mediante vortex hasta lograr la dilución del pellet bacteriano en el buffer. Este material fue incubado por una hora en Baño María a 60 °C. Seguidamente, fueron adicionados 800 µL de una solución de cloroformo: alcohol-isoamílico (24:1), homogenizados por inversión lenta y luego centrifugados por 10 minutos a 12,000 rpm para separación de fases. Posteriormente, se colectó el sobrenadante al que se le añadieron 600 µl de isopropanol frío, que fue mezclado mediante inversión suave y luego incubado a -20°C por una hora. Después de esta incubación la mezcla fue centrifugada por 8 minutos a 8.500 rpm, descartado el sobrenadante y lavado el pellet con 500 µL de etanol (70 %), que fue secado durante 30 minutos a temperatura ambiente,

diluido en 50 μL de agua destilada estéril y almacenado a $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$. e determinó la concentración de DNA total utilizando un espectrofotómetro nanodrop 200c. Posteriormente se igualaron las concentraciones de todas las muestras a una relación de 280/260 y los datos se convirtieron de $\mu\text{g/ml}$ a $\mu\text{g}/\mu\text{L}^{-1}$

Reacción para PCR

La PCR se preparó para un volumen de 25 μl , utilizando, 5 μl de buffer 5x, 2.0 μl dNTP's (2.5mM), 2.0 μl *primer* 8F (10 pM), 2.0 μl *primer* P1492R (10 pM), 0.4 μl Taq polimerasa (5u), 3 μl DNA (60-100 ng) y 10.6 μl de agua deionizada estéril, se centrifugó por 15 seg a 14,000 rpm. La PCR se llevó a cabo en un termociclador BIORAD, utilizándose una desnaturalización inicial de $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 2 minutos, seguida de 35 ciclos: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 minutos, $59\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1,5 minuto y extensión final a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 5 minutos. El producto obtenido fue analizado por electroforesis en gel de agarosa a 2 %, los productos amplificados se observaron en un transluminador de luz uv.

Los productos de PCR obtenidos, se limpiaron y purificaron con el kit QIAquick de QIAGEN, agregando 100 μl de buffer 1 (Binding Buffer) al tubo con el producto de PCR y mezclado por pipeteo. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 2 min y se eliminó el drenado de la columna. Se agregaron 700 μl de buffer 2 (Wash Buffer) y se centrifugó 2 veces a 10,000 rpm por 2 min eliminándose el drenado. La columna fue colocada en un tubo nuevo de 1.5 ml, previamente etiquetado, se le agregaron 20 μL de buffer 3 (Elution Buffer) y se centrifugó a 10,000 rpm por 2 min. El producto obtenido fue cuantificado con auxilio de un NanoDrop; y posteriormente utilizado para secuenciación.

3.7 Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo, se utilizó la metodología desarrollada por Chávez (2000), en un matraz Erlenmeyer con capacidad de 1000 ml y que contenía 800 ml

de agua destilada estéril, se agregó el contenido de 10 cajas de Petri con las colonias purificadas de la bacteria con la ayuda de un asa bacteriológica y se aforó a 1000 ml. Posteriormente, se ajustó a una concentración de 9×10^8 Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (cfu/ml), hasta lograr homologación visual, (turbidez) con la suspensión madre.

3.8 Evaluación de métodos de inoculación

Con el objetivo de evaluar el método de inoculación en la respuesta a la enfermedad de la escaldadura de la hoja en variedades de caña de azúcar, se emplearon tres métodos de inoculación: transmisión mecánica (machete), inyección y decapitado. Los cuales se detallan a continuación:

Transmisión mecánica (machete): consistió en cortar la planta de la caña, utilizando un machete que fue sumergido en el inóculo a una concentración de 9×10^8 (cfu/ml) en una cubeta plástica con una capacidad de 20 litros (Figura 9). Posteriormente, se procedió a cortar los tallos en la base de cada una de las variedades en estudio, empleándose 100 plantas.



Figura 9. Método de inoculación por transmisión mecánica a los cuatro meses de edad. **a)** Inóculo al 9×10^8 cfu/ml. **b)** aplicación del inóculo

Inyección: Consistió en inyectar con una jeringa hipodérmica un 1.0 mililitro de una suspensión bacteriana de *X. albilineans* a una concentración de 9×10^8 cfu/ml en el meristemo de la planta después el último collar visible aproximadamente, para ello se utilizaron 100 plantas (Figura 10).



Figura 10. Método de inoculación por inyección en las variedades de caña de azúcar evaluadas a los cuatro meses de edad.

Decapitado: Este método se efectuó realizando un corte transversal con tijeras de podar sobre el cogollo sin llegar al punto de crecimiento del tallo, entre la tercera y cuarta lígula visible (Figura 11). Después de realizado el corte se procedió a colocar un pedazo de algodón mojado con la suspensión bacteriana de *X. albilineans* a una concentración de 9×10^8 cfu/ml, utilizando 100 plantas (Figura 11).



Figura 11. Método de inoculación por decapitado a los cuatro meses de edad. **a)** corte de punta del tallo. **b)** Aplicación del inóculo en los tallos decapitado

Con el objetivo de determinar el método de inoculación más efectivo en la transmisión de la enfermedad de la escaldadura de la hoja se midieron las variables incidencia y severidad y se realizaron evaluaciones bimestrales obteniendo seis evaluaciones durante el experimento.

Se utilizó un diseño completamente al azar. Para el procesamiento estadístico de los datos experimentales se empleó un análisis de varianza simple. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05. Para valores expresados en porcentajes, la comparación de medias se efectuó según la prueba de proporciones para las variables incidencia y severidad.

La incidencia expresada en porcentaje se determinó de acuerdo a la relación de tallos enfermos (síntomas visibles) con el total de la población (tallos enfermos + tallos sanos) mediante la siguiente fórmula:

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

Dónde:

P.I. = Porcentaje de incidencia de la enfermedad (%)

ΣTA = Tallos enfermos (afectados)

ΣTT = Total de tallos (tallos enfermos + tallos sanos).

La severidad se determinó mediante la escala propuesta por Chavarría (2006) (Cuadro 2), en donde se realizaron observaciones mensuales.

Cuadro 2. Escala de evaluación para determinar la reacción a la enfermedad de la escaldadura de la hoja para las variedades de caña de azúcar en estudio.

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% del 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

4 RESULTADOS

4.1 Selección de muestras y aislamiento del patógeno *X. albilineans* causante de la enfermedad de la escaldadura de la hoja

Durante los muestreos realizados en el campo fue posible observar los síntomas típicos de la enfermedad de la escaldadura de la hoja en cuatro variedades de caña de azúcar CP 72-2086, MEX 69-290, MEX 79-431 y MEX 68-P-23 detectándose manchones con síntomas de la enfermedad, caracterizándose por la presencia de rayas blancas o raya amarillenta paralela en la nervadura provocando marchitamiento y necrosis foliar parcial o total (Figura 12a). Se observó el desarrollo de brotes laterales desde la base de los tallos y un acortamiento de los entrenudos (Figura 12b).



Figura 12. a) Síntomas externos de la escaldadura de la hoja en caña de azúcar en fase eclipse en la variedad MEX 79-431. **b)** Síntomas externos de la escaldadura de la hoja en caña de azúcar en fase crónica en la variedad CP 72-2086.

Durante la investigación los síntomas de la enfermedad en el campo se observaron en las variedades CP 72-2086, MEX 69-290, MEX 79-431 y MEX 68-P23. Chávez (2000) en un trabajo realizado en Cardel, Veracruz señala que se presentaron los síntomas clásicos de la enfermedad como son la presencia de rayas blancas y brotes laterales en las variedades MEX 69-290, MEX 68-P-28. Resultados que coinciden con este estudio en cuanto a la variedad MEX 69-290 con diferencias con las otras variedades muestreadas. Otros autores como Rott (1997) trabajando en caña de azúcar en las variedades MEX 64-1467, Q 177 en Veracruz encontraron presente la enfermedad. Asimismo, Huerta *et al.* (2003) observaron la presencia de este patógeno en las variedades Mex 64-1487, B 69-566, B 69-9379, CP 68-1023, esto puede ser debido a que en Veracruz las condiciones ambientales difieren con las que se presentan en el estado de Tabasco en esta época del año.

4.2 Aislamiento de la bacteria *X. albilineans*

Las bacterias que se cultivaron en el medio NBY permitieron la formación de colonias de color amarillo pálido, observándose la formación de las mismas a los seis días posteriores a la siembra (figura 13). Las colonias se caracterizaron por presentar un color amarillo pálido, no mucoides, húmedas, lisas, circulares, convexas según la descripción de Davis (1997)



Figura 13. Aislamiento de colonias de la bacteria *X. albilineans* sembradas en el medio de cultivo NBY.

La obtención de las colonias puras de las bacterias que causan la enfermedad de la escaldadura de la hoja, y que se obtuvieron en el NBY fueron colocadas en un medio de cultivo B de King. Las colonias cambiaron de un color amarillo pálido hacia un color amarillo intenso, lisas y brillantes (Figura 14), tal como lo describieron Davis *et al.* (1994) y Huerta (2004).



Figura 14. Colonias puras de *X. albilineans* cultivadas en medio de cultivo B de King.

En este trabajo fue posible obtener colonias puras cuando las colonias fueron transferidas al medio de cultivo B de King, a los 7 días de siembra. Los resultados obtenidos coinciden por los obtenidos por Huerta (2004), en cuanto a las

características morfológicas encontradas por el autor. El mismo autor, logró obtener en forma pura la bacteria *X. albilineans* a partir de diluciones 10^{-3} , en el medio de cultivo B de King después de siete días de la siembra. Las colonias cultivadas por este autor fueron de color amarillo pálido o miel, circulares, convexas, no mucoides, lisas y brillantes; sin embargo, cuando empleó la dilución 10^{-2} crecieron colonias de diferentes colores.

4.3 Caracterización molecular del agente causal de la escaldadura de la hoja mediante la técnica de PCR

Los resultados de las 27 muestras obtenidos mediante la técnica de PCR con los iniciadores 8F y 1492R permitieron amplificar 1500 bp del gen 16S rDNA ribosomal, se utilizaron dos marcadores de pesos (Figura 15).

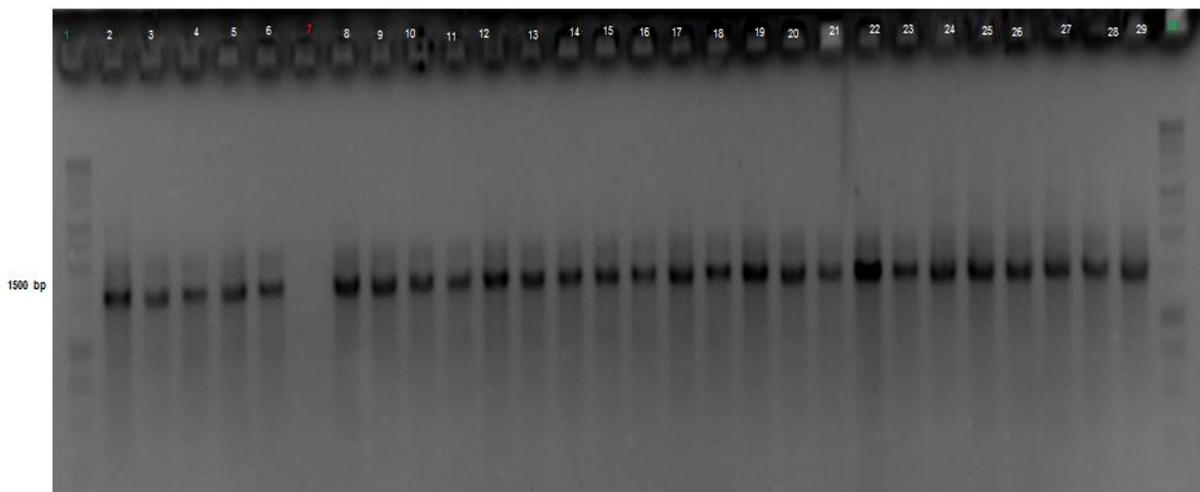


Figura 15. Amplificación de la banda correspondiente al gen 16S rRNA de ~1,500 bp

En otras investigaciones realizadas en la identificación molecular de la *Xanthomonas albilineans*; Huerta (2004) menciona que amplificó fragmentos de 288 pb de DNA utilizando los iniciadores PGBL1 y PGBL2.

Los resultados de la secuenciación en la muestra uno se identificó la bacteria *X. albilineans* con un porcentaje de identidad del 99% y un porcentaje de búsqueda

cubierta del 97% por lo que mostraron diferencias entre ellos (Cuadro 3). Las muestras 3,6,9,10,11,12,14,15,16, 18,19,20,22, 23, 24,25,27 ,28 y 29, no se secuenciaron .

Cuadro 3. Resultados del análisis de la secuenciación.

Núm. de cepas	Amplificación por PCR	Organismo identificado	Máx. Puntuación	Total puntuación	Consulta cubierta	E value	Max. identidad
1	1 kb	<i>Marcador de peso molecular</i>	-	-	-	-	-
2	1500 pb	<i>X. albilineans</i>	1151	115.1	97%	0	99%
3	1500 pb	-	-	-	-	-	-
4	1500 pb	<i>X. albilineans</i>	1085	1085	100%	0.0	99%
5	1500 pb	<i>X. albilineans</i>	525	525	100%	7e-146	99%
6	1500 pb	-	-	-	-	-	-
7	0	agua	-	-	-	-	-
8	1500 pb	<i>X. albilineans</i>	605	605	100%	3e-170	99%
9	1500 pb	-	-	-	-	-	-
10	1500 pb	-	-	-	-	-	-
11	1500 pb	-	-	-	-	-	-
12	1500 pb	-	-	-	-	-	-
13	1500 pb	<i>X. albilineans</i>	1059	2118	99	0.0	99%
14	1500 pb	-	-	-	-	-	-
15	1500 pb	-	-	-	-	-	-
16	1500 pb	-	-	-	-	-	-
17	1500 pb	<i>X. albilineans</i>	1110	2221	99%	0.0%	99%
18	1500 pb	-	-	-	-	-	-
19	1500 pb	-	-	-	-	-	-
20	1500 pb	-	-	-	-	-	-
21	1500 pb	<i>X. albilineans</i>	1164	1164	96%	0.0	99%
22	1500 pb	-	-	-	-	-	-
23	1500 pb	-	-	-	-	-	-
24	1500 pb	-	-	-	-	-	-
25	1500 pb	-	-	-	-	-	-
26	1500 pb	<i>X. albilineans</i>	992	992	100%	0.0	99%
27	1500 pb	-	-	-	-	-	-
28	1500 pb	-	-	-	-	-	-
29	1500 pb	<i>X. albilineans</i>	1164	1164	100%	0	100%
30	1 kb	<i>Marcador de peso molecular</i>	-	-	-	-	-

Realizando las comparaciones de las secuencias depositadas en el GenBank mostraron diferencias. Huerta (2003) señala que la variación se debe por los aislamientos realizados en variedades diferentes y puede estar asociado la disimilitud genéticas a que ambas son de diferentes regiones. Sin embargo, Valadez y Kahl, (2000) mencionaron que estas diferencias genética a nivel de bases de DNA en un mismo locus y mutaciones que aun siendo de una base en un gen, puede codificar para la síntesis de una nueva proteína, que podría resultar en un factor de virulencia, y llevar a la aparición de una nueva raza más patogénica y agresiva.

4.4 Evaluación de los métodos de inoculación para determinar la incidencia y la severidad de la escaldadura de la hoja en las variedades de caña de azúcar evaluadas

A los 15 días de cultivo se observó la presencia del patógeno en las variedades evaluadas. El método de inoculación que presentó el mayor porcentaje de incidencia de la enfermedad fue el método de inoculación por decapitado con un valor promedio de 10.38%, con diferencias significativas con los otros métodos utilizados (Figura 16). Mientras que, para el método de inyección el valor promedio de incidencia encontrado fue de 6.72% y para el método de transmisión mecánica fue de 4.50%.

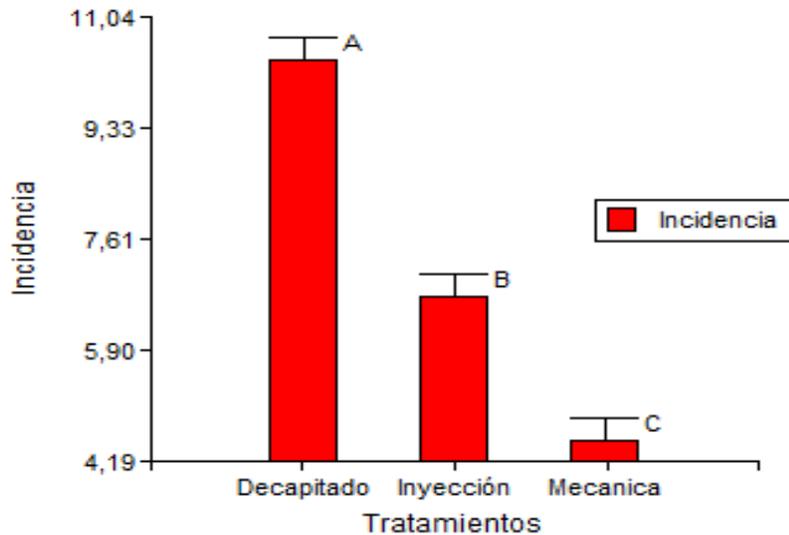


Figura 16. Métodos de inoculación para determinar el porcentaje de incidencia del patógeno causante de la enfermedad de la escaldadura de la hoja.

También se evaluó la incidencia, debido a que la enfermedad de la escaldadura puede estar presente en la fase eclipse y posteriormente se desaparece los síntomas de la enfermedad por tanto bajan los rendimientos del cultivo.

La severidad de la enfermedad de la escaldadura de la hoja en caña de azúcar evaluando las 41 variedades. El método de inoculación del decapitado presentó el mayor porcentaje de severidad con un promedio 8.37 % en el método decapitado seguido por el método de inyección con un 4.79% y método de transmisión mecánica fue de 3.21% (Figura 17).

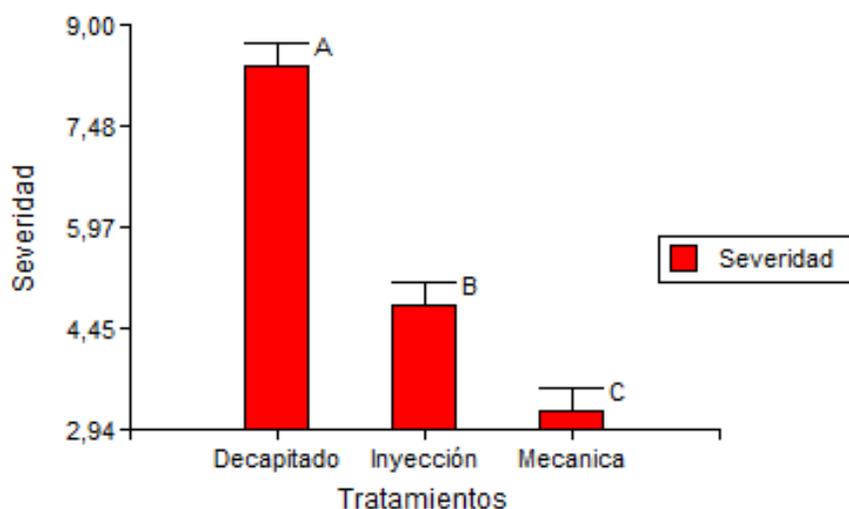


Figura 17. Métodos de inoculación para determinar el porcentaje de severidad del patógeno causante de la enfermedad de la escaldadura de la hoja.

Se encontró en la investigación que el método de inoculación con el cual se obtuvo el mayor valor promedio de severidad de la enfermedad de la escaldadura de la hoja fue con el método del decapitado. Estos resultados difieren por los alcanzados por Huerta (2004), quién evaluó hasta el ciclo soca en variedades de caña de azúcar y señala que el método más efectivo para incidencia y severidad se logró con el método de inoculación por inyección; Chávez (2000), también empleo el método de inoculación por decapitado evaluando 24 variedades en Ursulo Galvan en el estado de Veracruz.

El mayor porcentaje de incidencia de la escaldadura de la hoja evaluando las 41 variedades de caña de azúcar evaluados lo presentó la variedad COLPOSCTMEX 05-51 con un valor promedio de 35.67% con respecto al resto de los tratamientos evaluados (Cuadro 4), la variedad MEX 95-3, CP 89-1243, SP 74-5203, CP 87-1233, Mex 02-16, EMEX 00-62 y MEX 94-192 no presentaron incidencia.

Cuadro 4. Porcentaje de incidencia de 41 variedades de caña de azúcar a la enfermedad de la escaldadura de la hoja de la caña de azúcar.

Numero	Variedades	% de incidencia	Agrupación	Numero	Variedades	% de incidencia	Agrupación
28	COLPOSCTMEX 05-051	35.67	A	8	MEX 95-104	8	EFGHI
33	LGM 92-65	29	AB	22	B 46-492	7.67	EFGHI
9	B78-266	23.67	ABC	38	MEX 68 P 23	7.67	EFGHI
19	EMEX 0021	22.33	BCD	1	CP 94-1674	7.67	EFGHI
29	SP 72-4928	19.33	BCDE	21	MEX 95-52	7.33	EFGHI
10	MEX 95-60	18	BCDEF	2	SP 83-5073	7	EFGHI
3	COLMEX 95-27	17.67	BCDEFG	15	MEX 91-566	5.67	FGHI
32	LT MEX 94-2	16.67	BCDEFG	40	MEX 79-431	5.67	FGHI
26	CP 90-1424	16.33	BCDEFG	41	CO 997	5	GHI
17	ITV 92-1424	16.33	BCDEFG	37	MEX 69-290	5	GHI
13	L79-321	15.67	CDEFGH	4	COLMEX 94-8	3	HI
7	YZ 84-7	15	CDEFGH	6	TCP 89-3493	1.67	I
36	LT MEX 96-10	15	CDEFGH	11	MEX 96-19	1	I
12	SP 80-1815	14.67	CDEFGH	20	MEX 95-3	0	I
34	SP 71-6180	12.33	CDEFGHI	31	CP 89-2143	0	I
16	ITV 92-373	11.33	CDEFGHI	30	SP 74-5203	0	I
25	COLPOSCTMEX 05-224	11.33	CDEFGHI	35	CP 87-1233	0	I
39	CP 72-2086	11	CDEFGHI	27	MEX 02-16	0	I
23	SP 80-1816	11	CDEFGHI	14	EMEX 00-62	0	I
24	CXZ 75-644	11	CDEFGHI	5	MEX 94-192	0	I
18	CP 80-1743	10	DEFGHI				

Medias con una letra común no son significativamente diferente ($p \geq 0.05$)

La severidad que presentaron las 41 variedades evaluadas permitió clasificarla en cinco grupos (Cuadro 5) : **Resistente:** CP 87-1233, MEX 02-16, SP 74-5203, CP 89-2143, EMEX-0062, MEX 95-3, MEX 94-192; **Moderadamente Resistente:** MEX 95-104, SP 83-5073, CP 94-1674, , MEX 95-52, MEX 91-566, COLMEX 94-8, TCP 89-3493, MEX 96-19; **Moderadamente Susceptible:** MEX 95-60, COLMEX 95-27, ITV 92-1424, L79-321, CP 90-1424, LT MEX 96-10, LT MEX 94-2, COLPOS CT MEX 05-224, SP 71-6180, CXZ 75-644, SP 80-1815, SP 80-1816, ITV 92-373, CP 80-1743, B 46-492; **Susceptible:** COLPOS CT MEX 05-051, B78-266, LGM 92-65, EMEX 0021, SP 72-4928 y **Altamente Susceptible:** YZ 84-7.

Las variedades Co 997, MEX 68-P-23, MEX 79-431 y la MEX 69-290 bajo las condiciones ambientales del campo experimental del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco se clasificaron como moderadamente resistentes. Sin embargo, Chávez en (2000) bajo condiciones ambientales de Veracruz las clasificó como resistentes. Las variedades CP 72-2086, Co 997 y a las variedades MEX 68-P-23 y a la variedad MEX 69-290 como tolerante y a la variedad MEX 79-431 la clasificó como moderadamente resistente. La variedad CP 72-2086 en condiciones ambientales de Tabasco se clasificó como moderadamente susceptible.

Cuadro 5. Porcentaje de severidad y reacción a la enfermedad de la escaldadura de la hoja de variedades de caña de azúcar evaluadas.

Num.	Variedades	% de severidad	Agrupación	Reacción	Num.	Variedades	% de severidad	Agrupación	Reacción
5	MEX 94-192	0	J	R	16	ITV 92-373	7.67	EFGHIJ	MS
14	EMEX-0062	0	J	R	23	SP 80-1816	8	EFGHIJ	MS
20	MEX 95-3	0	J	R	39	CP 72-2086	8.33	DEFGHIJ	MS
27	MEX 02-16	0	J	R	12	SP 80-1815	8.67	CDEFGHIJ	MS
30	SP 74-5203	0	J	R	24	CXZ 75-644	9	CDEFGHIJ	MS
31	CP 89-2143	0	J	R	25	COLPOS CT MEX 05-224	9.33	CDEFGHIJ	MS
35	CP 87-1233	0	J	R	34	SP 71-6180	9.33	CDEFGHIJ	MS
11	MEX 96-19	0.67	J	MR	32	LT MEX 94-2	10.33	CDEFGHIJ	MS
6	TCP 89-3493	1	IJ	MR	26	CP 90-1424	12.33	CDEFGHIJ	MS
4	COLMEX 94-8	1.33	HIJ	MR	36	LT MEX 96-10	12.33	CDEFGHIJ	MS
37	MEX 69-290	2.67	GHIJ	MR	13	L79-321	13.67	CDEFGHI	MS
41	CO 997	3	GHIJ	MR	17	ITV 92-1424	13.67	CDEFGHI	MS
15	MEX 91-566	3.33	GHIJ	MR	3	COLMEX 95-27	14	CDEFGH	MS
21	MEX 95-52	3.67	GHIJ	MR	10	MEX 95-60	15	CDEFG	MS
1	CP 94-1674	4.33	FGHIJ	MR	29	SP 72-4928	16.67	CDEF	S
2	SP 83-5073	4.33	FGHIJ	MR	19	EMEX 0021	18.67	BCDE	S
8	MEX 95-104	4.33	FGHIJ	MR	33	LGM 92-65	21	ABCD	S
38	MEX 68 P 23	4.33	FGHIJ	MR	9	B78-266	21.33	ABC	S
40	MEX 79-431	4.33	FGHIJ	MR	28	COLPOS CT MEX 05-051	30.33	AB	S
22	B 46-492	6	EFGHIJ	MS	7	YZ 84-7	33	A	AS
18	CP 80-1743	7.33	EFGHIJ	MS					

Medias con una letra común no son significativamente diferente ($p > 0.05$)

AS = Altamente Susceptible **S** = Susceptible **MS** = Moderadamente Susceptible **MR** = Moderadamente Resistente **R** = resistente

En esta investigación las variedades que presentaron síntomas externos en la fase eclipse de la enfermedad de la escaldadura de la hoja fueron MEX 95-104, SP 83-5073, CP 94-1674, MEX 68 P 23, MEX 79-431, MEX 95-52, MEX 91-566, Co 997, MEX 69-290, COLMEX 94-8, TCP 89-3493 y MEX 96-19, se caracterizaron porque aparecen y desaparecen las rayas blancas, en las hojas jóvenes no presenta ninguna síntoma, en una misma planta puede registrarse como enferma o sana, dependiendo del momento en que se realiza la evaluación de la enfermedad (Figura 18). Tal como reportaron: (Bisessar, 1965; Rott *et al.*, 1994, 1995 y 1997; Lopes *et al.* 2001; Birch, 2001; Huerta *et al.*, 2003)



Figura 18. Síntomas externos en fase eclipse en las variedades evaluadas

Fase latente: Esta fase se observó en las variedades MEX 95-60, COLMEX 95-27, ITV 92-1424, L79-321, CP 90-1424, LT MEX 96-10, LT MEX 94-2, COLPOS CT MEX 05-224, SP 71-6180, CXZ 75-644, SP 80-1815, CP 72-2086, SP 80-1816, ITV 92-373, CP 80-1743 y B 46-492; que en la parte interna de los tallos maduros mostraron una coloración rojiza de los haces fibrovasculares, especialmente en los nudos de los canutos (Figura 19a y 19b); carecen de síntomas visibles, y su exacto diagnóstico, requiere de aislamiento del organismo y de pruebas serológicas. Esta fase ocurre en variedades resistentes o moderadamente tolerantes, tal como lo reportan Biessar, 1995; Flores, 1997; Rott *et al.*, 1994, 1995, 1997; Lopes *et al.*, 2001; Birch, 2001 y Huerta *et al.*, 2003.



Figura 19. Síntomas internos en fase latente

Fase aguda: En las variedades COLPOSCTMEX 05-051, B 78-266, LGM 92-65, EMEX 0021 y SP 72-4928, se observaron con síntomas clásicos, rayas blanquecinas, finas y bien definidas, que pueden presentar una o varias de ellas y éstas se distribuyen en forma paralela a la nervadura de la hoja (Figura 20). Una sola cepa presenta a menudo tallos enfermos y sanos; los tallos enfermos detienen su crecimiento, pueden producir brotes laterales o "lalas, las cuales son generalmente cloróticas. La sintomatología encontrada en las variedades antes descritas coinciden con lo señalado por Biessar, 1995; Flores, 1997; Rott *et al.*, 1994; 1995 y 1997; Lopes *et al.*, 2001; Birch, 2001; Huerta *et al.*, 2003..



Figura 20. Síntomas de la fase aguda de la escaldadura de la hoja en caña de azúcar variedad EMEX00-21

Fase crónica: Esta fase la presentó la variedad YZ 84-7, se caracterizó por la muerte súbita de la planta sin mostrar síntomas crónicos (Figura 21) tal como observaron Biessar, 1995; Flores, 1997; Rott *et al.*, 1994, 1995 y 1997; Lopes *et al.*, 2001; Birch, 2001; Huerta *et al.*, 2003.



Figura 21. Síntoma de la escaldadura de la hoja en fase crónica en la variedad YZ 84-7

5. CONCLUSIÓN

1. El medio B de King fue en el cual se purificó la bacteria de *X. albilineans*
2. Los iniciadores 8F y 1492R se identificaron la bacteria de *Xanthomonas albilineans* con un 99% de identidad y 97% de búsqueda cubierta; por lo tanto mostraron variación en las secuencias.
3. El método de inoculación del decapitado fue el presentó los porcentajes más altos de infección
4. De las 41 variedades evaluadas, siete variedades no mostraron síntomas típicos de la enfermedad.

6 RECOMENDACIONES

- 1.** Las variedades que resultaron resistentes, se deberán multiplicar y evaluar sus características agronómicas.
- 2.** Llevar a cabo monitoreos en las zonas cañeras del país de las variedades que resultaron tolerantes a susceptible a la escaldadura de la hoja en caña de azúcar.
- 3.** Continuar con el aislamiento y caracterización molecular el agente causal de la escaldadura de la hoja en las diferentes zonas geográficas del país.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agnihotri, V.P. (1990). Diseases of sugarcane and sugarbeet. Revised edition. Oxford IBN Publishing Co. PVT. Ltd., Nueva Delhi 483 p.
- Alexander, K.C., Viswanathan, R., Croft, B.J., Piggin, C.M., Wallis, E.S. and Hogarth, D.M. (1996). Major disease affecting sugarcane production in India and recent experiences in quarantine. Sugarcane germplasm conservation and exchange: report of an international workshop held in Brisbane, Queensland, Australia, 28-30 June, ACIAR Proceedings, 67:46-48.
- Almeida, I. M. G. de. (2010). Doenças causadas por bactérias. Pp. 437-450. Em: Cana de açúcar. Miranda, L. L. D., Vasconcelos, A. C. M. de, Landell, M. G. de A. Instituto Agronómico de Campinas.
- Alvarez, A.M. and Lou, K. (1985). Rapid identification of *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* by ELISA, Plant Disease, 69:1082-1086.
- Audy, P., Braat, C.E., Saindon, G., Huang, H.C and Laroche, A. (1996). A rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed, Phytopathology, 86:361-366.
- Bailey, R.A., Croft, B.J., Piggin, C.M., Wallis, E.S. and Hogarth, D.M. (1996). The sugarcane disease and quarantine situation in southern Africa. Sugarcane germplasm conservation and exchange: report of an international workshop held in Brisbane, Queensland, Australia, 28-30 June, ACIAR Proceedings, 67:34-35.
- Benedict, A.A., Alvarez, A.M., Berestecky, J., Imanaka, W., Mizumoto, C.Y., Pollard, L.W., Mew, T.W. and Gonzalez, C.F. (1989). Pathovar-specific monoclonal antibodies for *Xanthomonas campestris* pv. *Oryzae* and for *Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*, Phytopathology, 79:322-328.
- Birch, R. G. 2001. *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. Molecular Plant Pathology 2: 1-11.
- Birch, R.G., and S.S. Patil. (1983). The relation of blocked chloroplast differentiation to sugarcane leaf scald disease. Phytopathology. 73:1368-1374.

- Bisessar, S. (1965). Enfermedades y sus síntomas. Venezuela, Sug Bull. Agric. (Guyana). 33: pp.57-61.
- Chastel, J.M. (1994). Le sucre et ses marchés, Agriculture et développement, 4:4-11
- Chavarría S. E. (2006). Escalas Descriptivas para la evaluación de Enfermedades de la Caña de Azúcar. San José, Costa Rica, P.33.
- Chavez, M. R., (2000). Resistencia Varietal a la enfermedad de escaldadura de la caña de azúcar (Xanthomonas albilineans), Programa Nacional de Variedades del FOCYTCAÑA, México, D.F., 50 pp.
- China, A. y Rodríguez, E. (1994). Enfermedades de la caña de azúcar. Cuba, INICA. 100 p.
- Comstock, J.C. and Irey, M. (1992). Detection of the sugarcane leaf scald pathogen, Xanthomonas albilineans, using tissue blot immunoassay, ELISA and isolation techniques, Plant Disease, 76:1033-1035.
- Comstock, J.C., Croft, B.J., Piggin, C.M., Wallis, E.S. and Hogarth, D.M. (1996). Major diseases affecting sugarcane production in the United States. Sugarcane germplasm conservation and exchange: report of an international workshop held in Brisbane, Queensland, Australia, 28-30 June, ACIAR Proceeding, 67:24-26.
- Cório da Luz, W. (2000). Classificação dos seres vivos para o novo milênio. Parte I- O sistema de 25 Reinos em três domínios, RAPP, 8(1-25).
- Croft, B.J., Smith, G.R., Piggin, C.M., Wallis, E.S. and Hogarth, D.M. (1996). Major diseases affecting sugarcane production in Australia and recent experiences with sugarcane disease quarantine. Sugarcane germplasm conservation and exchange: report of an international workshop held in Brisbane, Queensland, Australia, 28-30 June, ACIAR Proceeding, 67:55-58.
- Davis, M.J., Rott, P. and Astua-Monge, G. (1998). Nested, Multiplex PCR for detection of both Clavibacter xyli subsp. xyli and Xanthomonas albilineans in sugarcane, Abstracts 7th International Congress of Plant Pathology, Edinburgh, Scotland, No.3.3.4.

- Davis, M.J., Rott, P. and Gabriel, D.W. (1995). Development of a PCR assay for diagnosis of leaf scald disease of sugarcane, *J. Am. Soc. Sugar Cane Technol.*, 16:129.
- Davis, M.J., Rott, P., Baudin, P. and Dean, J.L. (1994). Evaluation of selective media and immunoassays for detection of *Xanthomonas albilineans*, causal agent of sugarcane leaf scald disease, *Plant Disease*, 78:78-82.
- Davis, M.J., Rott, P., Warmuth, C.J., Chatenet, M. y Baudin, P. (1997): Intraspecific genomic variation within *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. *Phytopathology*. 87: 316-324.
- Domrachev, M., Federhen, S., Hotton, C., Leipe, D., Soussov, V.; Sternberg, R.; Turner, S. (2003) Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/ The NCBI Taxonomy Browser Homepage, National Center for Biotechnology Information.
- Dowson, W.J. (1943). On the generic names *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, and *Bacterium* for certain bacterial plant pathogens, *Trans. Br. Mycol.Soc.*, 26:1-14.
- Esquivel, E. A. (1975) Dos enfermedades importantes de la caña de azúcar en Panamá. *Fitopatología* 10 (2): 117-119.
- Flores, CS. (1997). Enfermedades de la caña de azúcar en México. 285 p.
- Hartung, J.S., Pruvost, O.P., Villemot, I. and Alvarez, A. (1996). Rapid and sensitive colorimetric detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by immunocapture and a nested-polymerase chain reaction assay, *Phytopathology*, 86:95-101.
- Henson, J.M., and French, R. (1993). The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis, *Annu. Rev. Phytopathol*, 31:81-109.
- Hernández, R. (2006). Análisis de la competitividad y productividad de las ramas y subramas de la agroindustria en México 1994-2004. Tesis profesional Departamento de Ingeniería agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo.

- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneat, P.H., Staley, J.T. and Williams, S.T. (1994). Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. Williams & Wilkins ed.
- Honeycutt, R.J., Sobral, B.W.S. and McClelland, M. (1995). tRNA intergenic spacers reveal polymorphisms diagnostic for *Xanthomonas albilineans*, *Microbiology*, 141:3229-3239.
- Hoy, J.W., and Grisham, M.P. (1994). Sugarcane leaf scald distribution, symptomatology, and effect on yield in Louisiana, *Plant Disease*, 78:1083-1087.
- Huerta, L. M. (2000). Susceptibilidad de 10 variedades comerciales de caña de azúcar (*Saccharum Officinarum* L.) a la *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, agente causal de la escaldadura de la Hoja en la región central costera de Veracruz. Tesis de Maestría en ciencias. Colegio de postgraduados, México. 73 pp.
- Huerta, L. M. (2004). La escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson): Diagnostico, Variabilidad y evaluación de resistencia en caña de azúcar. Tesis de Doctor en ciencias. Colegio de postgraduados, México. 4 p p, 51.
- Huerta, L.M., L.D. Ortega A., C. Landeros S., L. Fucikovsky z., y M. Marin. (2003). Repuesta de 10 variedades de caña de azúcar a la escaldadura de la (*Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson)), en la región central costera de Veracruz. *Agrociencia*. 37: 511-519.
- Iglesia, A., M. Díaz, E. Álvarez, E.L. Peralta, y V. Pazos (2003). Optimización del diagnóstico múltiple de la escaldadura de la escaldadura foliar y el raquitismo de los retoños de la caña de azúcar. *Rev. Protecc. Veg.* P.18.15-18.
- International Sugar Organization (2005), An International Survey of Sugar Crop Yields and Prices Paid for Sugar Cane and Beet. Market evaluation consumption and Mecas (05)05 Statistics Committee, 49 p.

- Irvine, J. E., Amador, J.M., Gallo, M.I.R., Riess, C.M., and Comstock, J. C. (1993). First report of leaf scald, caused by *Xanthomonas albilineans*, of sugarcane in Mexico, *Plant Disease* 77: 846
- Jensen, M.S., Webster, J.A. and Straus, N. (1993). Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59:945-952.
- Juárez, L. J; Valdez B. 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.
- Leite Júnior, R.P., Jones, J.B., Somodi, G.C., Mnsavage, G.V. and Stall, R.E. (1995). Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* associated with pepper and tomato seed by DNA amplification, *Plant Disease*, 79(9):917-922.
- Lopes, S.A. (1996). *Xanthomonas albilineans*: detection, identification and infectivity titration in sugarcane. Dissertation for PhD. in Plant Health. Department of Plant Pathology and Crop Physiology, Louisiana State University. 90 p.
- Lopes, S.A. and Damann, K.E. (1996). Imunocaptura e detecção pela PCR de *Xanthomonas albilineans* em seiva vascular de folhas de cana-de-açúcar, *Summa Phytopathologica*, 22:244-47.
- Lopes, S.A., K.E. Damann, J. W. Hoy, and M.P. Grisham. (2001). Infectivity titration for assessing resistance to leaf scald among sugarcane cultivars. *Plant Dis.* 85:592-596.
- Louws, F.J., Rademaker, J.L.W. and de Bruijn, F.J. (1999). The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto-bacteria: diversity, detection, and disease diagnosis, *Annu. Rev. Phytopatol.*, 37:81-125.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. (2000). *Brock biology of microorganism*, 9^a ed. Prentice-Hall, Inc.
- Maidak, B.L., Cole, J.R., Parker, C.T.J., Garrity, G.M., Larsen, N.L.,B., Lilburn, T.G., Mc caughey, M.J., Overbeek, R., Pramanik, S., Schmidt, T.M., Tiedje,

- J.M. and Woese, C.R. (1999). A new version of the RDP (Ribosoma Database Project), *Nucleic Acids res*, 27:171-173.
- Manulis, S., Valinsky, L., Lichter, A. and Gabriel, D.W. (1994). Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* with DNA primers and probes identified by random amplified polymorphic DNA analysis, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60:4094-4099.
- Martín, J.P. and Robinson, P.E. (1961). Leaf scald. Pages 79-107, In: *Sugar Disease of the World*, Vol 1. J.P. Martin, E.V. Abbott, and C.G. Hughes, eds. Elsevier Publishing Co., Amsterdam.
- McManus, P.S. and Jones A.L. (1995). Detection of *Erwinia amylovora* by nested PCR dot-blot and reserve-blot hybridizations, *Phytopathology*, 85:618-623.
- North, D.S. (1926). Leaf scal, a Bacterial Disease of sugarcane. Agric. Rep. No. Colonial Sugar Refining Co., Ltd., Sydney, Australia.
- Palleroni, N.J. and Bradbury, J.F. (1993). *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al.1983, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43:606-609.
- Pan, Y.B., Grisham, M.P. and Burner, D.M. (1997). A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of sugarcane leaf scald disease. *Plant Disease*, 81:189-94.
- Pan, Y.B., M.P. Grisham, D.M. Burner, B.L. Legendre, and Q. Wey. (1999). Development of polymerase chain reaction primers highly specific for *Xanthomonas albilineans*, the causal bacterium of sugarcane leaf scald disease. *Plant Dis.*83:218-222.
- Parra, V., A.I. 1993. Un nuevo problema sanitario en la industria azucarera de México. In Riestra Díaz D., Pichardo Hernández, S., Marín García, M y Zedillo Ponce de León, L.E. (Eds). *Memoria del Simposio Nacional Sobre la Capacitación y Desarrollo Tecnológico en el Campo Cañero Mexicano*. Tomo I. Xalapa, Ver. 805 p.

- PRONAC, (2007), Programa Nacional de la Agroindustria de la Caña de Azúcar. Gobierno Federal en: <http://www.sagarpa.gob.mx/cgcs/discursos/2007/abril/Pronac.pdf>.
- Ramallo, J., Haelterman, R., Ramallo, N.E. and Lunello, P. (1999). Production of specific antiserum of *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson: its application in the serological diagnosis of leaf scald in sugarcane, *Avance agroindustrial*, 20:16-19.
- Ricaud, C. and Ryan, C.C. (1989). Leaf scald: In: Diseases of sugarcane. Major diseases. Eds: C Ricaud, BT Egan, AG Gillaspie Jr & C.G Hughes. Amsterdam. The Netherlands: Elsevier Science Publishers: 39-58, 39-45
- Rott P., D. Soupa, Y Brunet, P. Feldmann, and P. Letourmy. (1995). Leaf scald (*Xanthomonas albilineans*) incidence and its effect on yield in seven sugarcane cultivar in Guadalupe. *Plant Pathology* 44:1075-1084.
- Rott P., I.S. Mohaemd, P. Klett, D. Soupa, A. de Saint-Albin, P. Feldman, and P. Letourmy. (1997). Resistance to leaf scald disease is associated with limited colonization of sugarcane and wild relatives by *Xanthomonas albilineans* *Phytopathology* 87:1202-1213.
- Rott, P. (1995). Leaf scald of sugarcane. *Agriculture and Development*; CIRAD-CA, 51-58.
- Rott, P. and Davis, M.J. (2000). Leaf scald. In: A guide to sugarcane diseases, CIRAD and ISSCT 2000, p.163-169.
- Rott, P., Arnaud, M. and Baudin, P. (1986). Serological and lysotypical variability of *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, causal agent of sugarcane scald disease, *Journal of Phytopathol*, 116:201-211
- Rott, P., Chatenet, M., Graznier, M. y Baudin, P. (1988). Le ´chaudure des femilles de canne a ´ sucre proroguee ´ par *Xanthomonas albilineans* (Asbhy) Dowson. II Diagnostic et spectres d ´hotes de l ´agent pathogène en Afrique Tropicale, *Agron. Trop*, 43:244-251.
- Rott, P., Daugrois, J.H., Girard, J.C., Croft, B.J., Piggin, C.M., Wallis, E.S. and Hogarth, D.M. (1996b). Major diseases affecting sugarcane production in

- Guadeloupe and Reunion Island, and recent experiences with sugarcane disease in quarantine at CIRAD-CA in Montpellier. Sugarcane germplasm conservation and exchange: report 116 of an international workshop held in Brisbane, Queensland, Australia, 28-30 June, ACIAR Proceeding, 67:49-50.
- Rott, P., Davis, M.J. and Baudin, P. (1994). Serological variability in *Xanthomonas albilineans*, causal agent of leaf scald disease of sugarcane, *Plant Pathology*, 43:344- 349.
- Rott, P.C., Costest, L., Davis, M.J., Frutos, R. and Gabriel, D.W. (1996a). At least two separate gene clusters are involved in albicidin production by *Xanthomonas albilineans*, *J. of Bacteriol.*, 178:4590-4596.
- 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*. *Emerg Infect Dis* 8, 1117–1123.
- Schaad, N.W., R.D. Freederick, J. Shaw, W.L. Schneider, R. Hickson, M.D. Petrillo, and D.G. Luster. (2003). Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41:305-324.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), (2012), con información de las Delegaciones de la Sagarpa, avance de siembras y cosechas, resumen nacional por estado (Perennes) 2012; Riego+Temporal.
- Shaad, N.W., Jones, J.B. y 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.
- Suma, S., Pais, E., Croft, B.J., Piggitt, C.M., Wallis, E.S. and Hogarth, D.M. (1996). Major disease affecting sugarcane production on the Ramu sugar state, Papua New Guinea. Sugarcane germplasm conservation and exchange: report of an international workshop held in Brisbane, Queensland, Australia 28-30 June 1995. 1996, 30-33; ACIAR Proceeding, No.67, 13.

- Tokeshi, H. (1997). Doença da cana de açúcar. ESALQ./USP, Editora Agronômica, CERES Ltda/SA. P.10-13.
- Tsai, C.C., Lin, C.P. and Chen, C.T. (1990). Characterization and monoclonal antibody production of *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, the causal agent of sugarcane leaf scald disease, *Plant Prot. Bull*, 32:125-135.
- Valadez. E., G. Kahl.2000 Huellas de ADN en genomas de plantas.Edit. Mundi Prensa C.V., México, D.F. 147 pp.
- Valdez B. A., Guerrero P. A; García L. E; Obrador O. J;(2009), Manual para el cultivo y producción de caña de azúcar. Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco.
- Valdez, B. A. (2010). Reporte técnico de la enfermedad de la escaldadura (*Xanthomonas albilineas*) y gomosis (*Xanthomonas vascularum*). Colegio de Postgraduados.
- Van den Mooter, M. and Swings, J.(1990) Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40:348-369.
- Vauterin, L. and Swings, J, 1997). Are classification and phytopathological diversity compatible in *Xanthomonas*, *Journal of Industrial Microb. & Biotechnolgt*, 19:77-82.
- Vauterin, L., Hoste, B., Yang, P., Alvarez, A., Kersters, K., and Swings, J. (1993). Taxonomy of the genus *Xanthomonas*, In: *Xanthomonas*, Swings J.G. and E.L. Civerolo (Ed.), Chapman & Hall, London, Cap.3, pp. 157-192.
- Vauterin, L., Rademaker, J. and Swings, J. (2000). Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*, *Phytopathology*, 90:677-682.
- Victoria, J., I., Guzmán, M.L. Y Ángel, F. (1995). Enfermedades de la caña de Colombia. En C. Cassalett, J. Torres y C. Isaacs (eds). *El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia*. P. 265-293.

- Victoria, J.I., Viveros, C., Cassalet, C. y Calderón, H. (1997). Establecimiento de semilleros limpios, serie técnica No. 22. Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia (CEÑICANÍA), Cali. Colombia p.19.
- Wang, Z. K., Comstock, E., Hatziloukas and Schaad, NW. (1999). Comparison of PCR, Bio-PCR, DIA, ELISA and isolation on semi selective medium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald, *Plant Pathology*, 48:245- 252.
- Welsh, J. and McClelland, M. (1991). Genomic fingerprints produced by PCR with consensus tRNA gene primers, *Nucleic Acids Res*, 19:861-866.
- Wilbrink, G. (1920). De Gomziekte van het Suikerriet, hare Oorzaak en hare Bestrijding, *Arch. Suikerind. Ned. Indie*. 28:1399-1525.
- Woese, C.R., Kandler, O. and Wheelis, M.L. (1990). Towards a natural system of organism: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:4576-4579
- Wu, M.F.; Lin, C.P., and Chen, C.T. (1990). Isolation, cultivation and monoclonal antibody production of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal agent of sugarcane ratoon stunting disease, *Plant Prot. Bull.*, 32:91-99.
- Zhang, L. Xu, J. and Birch, R.G. (1999): Engineered detoxification confers resistance against a pathogenic bacterium, *Nature-Biotechnology*. 17:1021-1024.

8. ANEXOS

Anexo 1. Amplificación por PCR del DNA ribosomal (16S)

Para amplificar se utilizó los primers 8F y 1492R, según la siguiente mezcla de reacción (Master mix).

Reactivo	Cantidad por reacción (µL)
Buffer 5X	5,0
dNTP's (2.5mM)	2,0
Primer P&F (10 pM)	2,0
Primer P1492R (10 pM)	2,0
Taq Polimerasa (5U)	0,4
DNA (60 a 100 ng)	3
H ₂ O	10,6
Total	25.0

Anexo 2. Preparación de gel agarosa

Una vez terminado el proceso de PCR, se evaluó la calidad y el tamaño del amplificado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, según el siguiente protocolo:

1. Se pesó 3 g de agarosa y resuspenderla en 200 mL de buffer TAE 1X (40mM Tris base pH 7.8, 20 mM acetato de sodio y 2 mM EDTA)
2. Se llevó el matraz al horno de microondas y se calentó dos veces por 2 minutos.
3. Se dejó enfriar hasta 55 °C y vaciar el gel.
4. Se colocó 5 µL de las muestras en cada pozo.

5. En el primer pozo se colocaron 2 μ L del marcador de peso.
6. Se realizó la corrida de electroforesis a 80 voltios constantes aproximadamente 2.5 horas.
7. El gel se tiñó con una solución de Bromuro de Etidio (10 mg/mL) o Gel Red (Dil. 1/10.000) por 15 minutos.
8. Los segmentos de DNA amplificados por PCR se visualizaron con la luz ultravioleta en un foto documentador computarizado

Anexo 3. Análisis de Varianza evaluando incidencia con los 3 métodos de inoculación

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F Calculada	P-valor
Modelo.	18790.23	42	447.39	30.96	<0.0001
Variedades	16622.87	40	415.57	28.75	<0.0001
Tratamientos	2167.37	2	1083.68	74.98	<0.0001
Error	4711.52	326	14.45		
Total	23501.76	368			

Anexo 4. Prueba de Tukey evaluando incidencia evaluando con los 3 métodos de inoculación

Variedad	Media	Agrupación	Variedad	Media	Agrupación
28	29.89	A	21	5.44	GHIJK
9	24.11	AB	18	5.22	GHIJK
33	17.67	BC	22	4.78	GHIJK
19	17.67	BC	2	4.56	HIJK
10	15.56	CD	40	4.33	HIJK
17	14.56	CDE	38	4.33	HIJK
29	14	CDEF	1	4.33	HIJK
26	11.67	CDEFG	15	4.11	HIJK
3	11.11	CDEFGH	41	2.67	IJK
36	10.89	CDEFGH	37	2	IJK
12	10.22	DEFGH	4	1	IJK
13	10	DEFGH	6	0.56	JK
39	8	EFGHI	11	0.44	K
32	7.89	EFGHI	30	0.33	K
34	7.67	EFGHI	20	0.11	K
7	7.56	EFGHIJ	14	0	K
16	7	FGHIJK	5	0	K
24	6.89	GHIJK	27	0	K
25	6.78	GHIJK	35	0	K
8	6	GHIJK	31	0	K
23	6	GHIJK			

Anexo 5. Comparación de medias entre tratamientos evaluado incidencia utilizando tukey ($\geq p0.05$)

Tratamientos	Medias	Agrupamiento
Decapitado	10.38	A
Inyección	6.72	B
Mecánica	4.5	C

Anexo 6 Análisis de Varianza evaluando severidad con los 3 métodos de inoculación

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F calculada	P-valor
Modelo.	13666.06	42	325.38	22.06	<0.0001
Variedades	11944.27	40	298.61	20.24	<0.0001
Tratamientos	1721.79	2	860.90	58.35	<0.0001
Error	4809.54	326	14.75		
Total	18475.6	368			

Anexo 7. Prueba de Tukey evaluando severidad evaluando con los 3 métodos de inoculación

Variedad	Media	Agrupación	Variedad	Media	Agrupación
28	25.78	A	8	3.56	HIJK
9	20.78	A	22	3.44	HIJK
7	13.33	B	15	3.22	HIJK
33	12.78	BC	2	3	HIJK
10	12.22	BCD	40	2.89	HIJK
17	12.11	BCDE	1	2.56	HIJK
29	11.67	BCDEF	21	2.33	HIJK
19	10.89	BCDEFG	38	2.22	HIJK
26	8.67	BCDEFGH	41	1.56	IJK
3	8.56	BCDEFGHI	37	1.22	JK
13	7.89	BCDEFGHIJ	4	0.44	K
36	7.56	BCDEFGHIJ	6	0.33	K
34	5.78	CDEFGHIJK	11	0.33	K
25	5.56	DEFGHIJK	30	0.22	K
32	5.11	EFGHIJK	20	0.11	K
12	5.11	EFGHIJK	5	0	K
39	5	FGHIJK	14	0	K
24	5	FGHIJK	27	0	K
16	4.56	GHIJK	31	0	K
23	4.22	GHIJK	35	0	K
18	3.78	HIJK			

Anexo 8. Comparación de medias entre tratamientos evaluado incidencia utilizando tukey ($\geq p0.05$)

Tratamientos	Medias	Agrupamiento
Decapitado	8.37	A
Inyección	4.79	B
Mecánica	3.21	C

Anexo 9. Análisis de Varianza evaluando incidencia con el método de decapitado

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadro Medio	F calculada	P-valor
Modelo.	8479.71	40.00	211.99	13.87	>0.0001
Variedades	8479.71	40.00	211.99	13.87	>0.0001
Tratamientos	0.00	0.00	0.00	sd	Sd
Error	1253.33	82.00	15.28		
Total	9733.04	122.00			

Anexo 10. Análisis de Varianza evaluando severidad con el método de decapitado

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F Calculada	P-valor
Modelo.	7836.13	40	195.90	12.72	>0.0001
Variedades	7836.13	40	195.90	12.72	>0.0001
Tratamientos	0	0	0.00	sd	
Error	1262.67	82	15.40		
Total	9098.8	122			