



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

PROGRAMA PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

DIAGNÓSTICO DE *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson Y *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* EN CAÑA DE AZÚCAR EN LA CHONTALPA, TABASCO, MÉXICO

HERMEREGLDO SALOMÓN GARCÍA JUÁREZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO

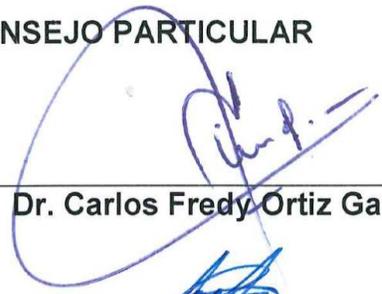
2014

La presente tesis, titulada: “**Diagnóstico de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson y *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* en caña de azúcar en la Chontalpa, Tabasco, México**”, realizado por el alumno: Hermeregildo Salomón García Juárez, 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
EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

Consejero


Dr. Carlos Fredy Ortiz García

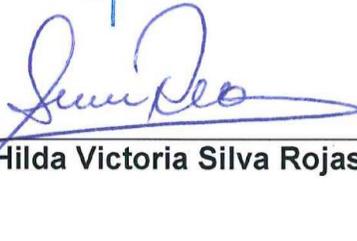
Asesor


Dr. Sergio Salgado García

Asesor


Dr. Apolonio Valdez Balero

Asesora


Dra. Hilda Victoria Silva Rojas

H. Cárdenas, Tabasco, 9 de Diciembre de 2014

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a Dios, que me da la oportunidad de vivir y ver el milagro de cada amanecer, a mi querida esposa Isabel por su amor y apoyo incondicional, a mi futuro hijo (a) que va a ser el motor de mi vida y espero que le sirva de ejemplo he inspiración. A mis padres Felipe[†] y Juana por su orientación, apoyo y ejemplo de vida, que me ayudan a sobresalir en la vida; en especial, a mi madre por los sacrificios y esfuerzos que realizó a lo largo de..... siempre, ayudándome a seguir adelante ante cada adversidad presentada... a mis hermanas y hermanos, así como los demás integrantes de mi familia. Muchas gracias a todos!!!!!!

AGRADECIMIENTOS

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de estudio asignada durante mis dos años de maestría, al igual al Instituto Interamericano de Cooperación Agrícola (IICA) por ser la institución mediador en la obtención de esta beca de estudios.

Al Colegio de Postgraduados en particular al Campus Tabasco, por permitirme realizar mis estudios de maestría en ciencias y así alcanzar esta meta en mi vida, además de poder pertenecer a esta grandiosa comunidad de egresados del COLPOS.

Siempre estaré agradecido con mi profesor consejero Dr. Carlos Fredy Ortiz, por su valiosa guía, asesoría y paciencia durante mis estudios, lo que permitió culminar oportunamente este trabajo. Así mismo quiero agradecer a los otros miembros de mi comité Dr. Sergio Salgado García, Dr. Apolonio Valdez Balero y a la Dra. Hilda Victoria Silva Rojas, por sus aportaciones en la realización de mi tesis.

Al Dr. Mario Melgar, Director del Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la caña de Azúcar (CENGICAÑA) y al mismo centro de investigación por otorgarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría en ciencias.

A los Ing. Mc. Werner Ovalle, Fredy Longo y al Dr. José Luis Queme, por ponerme en el camino de la investigación, y sobre todo por su valiosa amistad.

Al personal de laboratorio de fitopatología del Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, así como el personal de los laboratorios de bacterias y genética del 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 mis compañeros de generación primavera 2013 por los gratos momentos compartidos, espero que este lazo de amistad nunca se pierda.

A la línea de investigación dos -LPI2- por el apoyo económico brindado para poder cumplir con los objetivos planteados.

Al personal de los Ingenios Presidente Benito Juárez y Santa Rosalía, en especial a los Ingenieros Rafael Calleja Aguirre y José Juan Cruz Villanueva, por el apoyo brindado en la toma de muestras en la zona de estudio.

A Lorenzo Hernández, Eder Ramos, José Gabriel, por la ayuda desinteresada que me brindaron.

INDICE GENERAL

1 INTRODUCCION	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos particulares	3
3 HIPÓTESIS	3
4 REVISION DE LITERATURA	4
4.1 El cultivo de la caña de azúcar	4
4.1.1 Descripción botánica	6
4.1.2 Morfología de la planta	6
4.2 Enfermedades de la caña de azúcar	8
4.3 La escaldadura de la hoja	9
4.3.1 Agente causal.....	10
4.3.2 Descripción morfológica	10
4.3.3 Sintomatología	11
4.3.4 Transmisión de la enfermedad	13
4.3.5 Importancia económica de la enfermedad.....	14
4.4 Raquitismo de las socas de la caña de azúcar	15
4.4.1 Agente causal.....	15
4.4.2 Descripción morfológica	16
4.4.3 Sintomatología	16
4.4.4 Transmisión de la enfermedad	17
4.4.5 Importancia económica de la enfermedad.....	18

4.5 Manejo de las enfermedades bacterianas en la caña de azúcar.....	19
4.6 Diagnóstico de enfermedades.....	21
4.6.1 Técnicas serológicas o inmunoquímicas.....	21
4.6.2 Técnicas moleculares.....	22
5 MATERIALES Y METODOS.....	24
5.1 Área de estudio.....	24
5.2 Diagnóstico y determinación de la distribución de la enfermedad.....	24
5.2.1 Puntos de muestreo.....	24
5.2.2 Toma de muestras.....	26
5.3 Análisis serológico.....	28
5.3.1 Saturación de la membrana con lactosa.....	29
5.3.2 Primer anticuerpo.....	29
5.3.3 Segundo anticuerpo.....	29
5.3.4 Sustrato de trabajo.....	29
5.3.5 Revelado de membranas.....	30
5.4 Aislamiento de <i>Xanthomonas albilineans</i>	30
5.4.1 Toma de muestras de material vegetal.....	30
5.4.2 Aislamiento.....	31
5.5 Identificación molecular de los aislamientos.....	32
5.5.1 Extracción de DNA.....	33
5.5.2 Amplificación por PCR del loci ribosomal 16S.....	33
5.5.3 Secuenciación.....	34
5.6 Análisis de datos.....	34

6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
6.1	Análisis serológico.....	36
6.2	Presencia de escaldadura (<i>X. albilineans</i>) por factor de estudio.....	38
6.2.1	Análisis por clon	38
6.2.2	Análisis por tipo de suelo y regimen de lluvia	39
6.3	Distribución espacial de sitios positivos a <i>X. albilineans</i>	40
6.4	Porcentaje de Incidencia de <i>X. albilineans</i>	41
6.5	Presencia de raquitismo (<i>L. xyli</i> subsp. <i>xyli</i>) por factor de estudio	43
6.5.1	Análisis por clon	43
6.5.2	Análisis por tipo de suelo y regimen de lluvia	44
6.6	Distribución espacial de sitios positivos a <i>L. xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	45
6.7	Porcentaje de Incidencia de <i>L. xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	46
6.8	Identificación de <i>X. albilineans</i>	48
6.8.1	Aislamiento de <i>X. albilineans</i>	48
6.8.2	Identificación molecular de <i>X. albilineans</i>	49
7	CONCLUSIONES	53
8	RECOMENDACIONES	54
9	LITERATURA CITADA	55
10	ANEXOS	66

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Reportes de pérdidas ocasionadas por la enfermedad del raquitismo de las socas en diferentes localidades.	19
Cuadro 2. Porcentaje de incidencia de <i>X. albilineans</i> en tallos de caña de azúcar de cinco clones cultivadas en cuatro tipos de suelo de dos régimen de lluvia en los 105 sitios muestreados de la zona Chontalpa, Tabasco, México.	42
Cuadro 3. Porcentaje de incidencia de <i>L. xyli</i> subsp. <i>xyli</i> en tallos de caña de azúcar de cinco clones, cultivados en cuatro tipos de suelo en dos régimen de lluvia en los 105 sitios muestreados de la zona Chontalpa, Tabasco, México.	47

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ingenios azucareros en México.	5
Figura 2. Etapas fenológicas del cultivo de la caña de azúcar.	8
Figura 3. Figura 3. Planta y tejidos de caña de azúcar con infección natural de <i>X. albilineans</i> mostrando distintos síntomas externos e internos: a. línea de lápiz en limbo foliar; b. emisión de brotes laterales; c. sección interna del nudo mostrando cambio de coloración de los haces vasculares (Fotografías tomadas de Ovalle, 2012).	12
Figura 4. Detalles de los efectos de <i>L. xyli</i> en el clon CG98-62: a. Efecto de la infección por <i>L. xyli</i> en los tallos; b. Líneas de color rojizo en la base de un nudo de un tallo infectado.	17
Figura 5. Distribución de los puntos de muestreo en la zona de abasto del Ingenio Presidente Benito Juárez; consideraron tres factores: los cinco clones más cultivadas, dos régimen de precipitación y tres tipos de suelos.	25
Figura 6. Distribución de los 105 puntos de muestreo en la zona cañera de la Chontalpa, del estado de Tabasco.	26
Figura 7. Secuencia de muestreo de tallos: a. Recorrido diagonal realizado durante el muestreo sistemático; b. sección de tallo colectado para la detección de <i>X. albilineans</i> ; c. sección de tallo colectado para la detección de <i>L. xyli</i> subsp. <i>Xyli</i> ; d. muestra de 10 secciones de tallo de caña de azúcar.	27

Figura 8. Secuencia de extracción de jugo de los tallos e impregnado en membranas: **a.** Dispositivo utilizado para la obtención de jugo; **b.** Jugo obtenido a 80 psi de presión; **c.** 2.5 µl de jugo en punta de una micropipeta; **d.** deposición de jugo en membrana de nitrocelulosa; **e.** colocación de los testigos positivos y negativos; **f.** Proceso de fijación de las muestras a la membrana mediante calor seco a 70 ± 1 °C.

28

Figura 9. Secuencia fotográfica del aislamiento de *X. albilineans*: **a.** Colecta de material vegetativo; **b.** Síntoma de la forma crónica conocido como línea de lápiz; **c.** Flujo bacteriano observado en un microscopio de contraste de fases; **d.** Desinfección del material vegetativo con hipoclorito al 3%; **e.** corte de muestras en porta objetos en cruz; **f.** siembra en medio de cultivo Agar Nutritivo.

32

Figura 10. Resultados del análisis serológico de las membranas de nitrocelulosa, se observan los testigos positivos identificados con el signo + y los testigos negativos con el signo –: **a.** membrana con una muestra positiva a escaldadura; **b.** membrana con una muestra positiva a raquitismo de las socas.

36

Figura 11. Ubicación de los sitios de muestreos de *X. albilineans* correspondientes a las plantaciones de caña de azúcar por resultado: puntos de muestreo color café, puntos positivos color verde.

41

Figura 12. Ubicación de los sitios de muestreos de *L. xyli* subsp. *xyli* correspondientes a las plantaciones de caña de azúcar por resultado: puntos de muestreo color café, puntos positivos color verde.

46

Figura 13. Figura 13. Detalles del aislamiento de <i>X. albilineas</i> : a. Hoja de caña de azúcar con síntoma de línea de lápiz empleada en el aislamiento de la bacteria <i>X. albilineas</i> ; b. colonias bacterianas típicas de dicha bacteria en agar nutritivo; c. Acercamiento fotográfico de las colonias típicas de <i>X. albilineas</i> .	49
Figura 14. Figura 14. Amplificación por PCR. Línea 1: marcador de peso molecular (1kb); 2-3: células de <i>X. albilineans</i> .	50
Figura 15. Secuencia nucleotídica de <i>X. albilineans</i> obtenida del aislamiento de la bacteria en plantas sintomáticas en plantaciones cañeras de la zona Chontalpa, del estado de Tabasco, México.	51
Figura 16. Árbol filogenético, construido por el método de Máxima parsimonia con 1000 repeticiones bootstrap usando el programa MEGA 6.05. En el árbol filogenético se contrasta la secuencia obtenida del aislamiento de Tabasco, contra la cepa de referencia, otras especies de <i>Xanthomonas</i> y otros patógenos bacterianos que afectan el cultivo de la caña de azúcar.	52

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Puntos de muestreo por clon, tipo de suelo y régimen de humedad de las 105 plantaciones muestreadas.	66
Anexo 2. Descripción de los clones bajo estudio	70
Anexo 3. Equipo utilizado para la extracción de jugo a partir de los entrenudos de los tallos colectados en los 105 puntos de muestreo.	73
Anexo 4. Membranas de nitrocelulosa, obtenidas después del análisis serológico por el método " <i>Dot blot immunoassay</i> "	74

Diagnóstico de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson y *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* en caña de azúcar en la Chontalpa, Tabasco, México

RESUMEN

Hermeregildo Salomón García Juárez, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2014

La escaldadura de la hoja y el raquitismo de las socas son de las enfermedades de mayor importancia debido a las enormes pérdidas que provocan a nivel mundial, aunque recientemente en Tabasco se han señalado su presencia, éstas aún no se han confirmado. Así el presente trabajo se planteó con el objetivo de diagnosticar la presencia y distribución de las bacterias *Xanthomonas albilineans* y *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* agentes causales de dichas enfermedades respectivamente. La investigación se realizó en la zona cañera de la Chontalpa, Tabasco. Para lo cual se realizó un muestreo dirigido considerando tres factores: 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, Fluvisol), y dos regímenes de precipitación (1793-1936 mm y 1937-2085 mm); con tres repeticiones, lo que generó la observación de 105 plantaciones. La georeferenciación de las plantaciones se realizó sobre el mapa de suelos y de los polígonos de Thiessen escala 1:50,000. En cada plantación se colectaron sistemáticamente 10 tallos de diferentes puntos; a los que se extrajo jugo que se impregnó a una membrana de nitrocelulosa, mismas que se revelaron por el método “*Dot blot immunoassay*”. Los resultados indican la presencia de *X. albilineans* con una expresión tipo latente en tres clones (Mex 69-290, Mex 68-P-23 y Mex 79-431); y de *L. xyli* subsp. *xyli* en cuatro clones (CP 72-2086, Mex 68-P-23, Mex 69-290 y RD-75-11); la distribución de ambas enfermedades es focalizada. Paralelamente se realizaron aislados de la bacteria *X. albilineans* a partir de plantas sintomáticas para su identificación molecular. Así, se amplificó y secuenció un fragmento de 1392 pb de la región 16S rDNA, obteniendo máxima identidad (100%) con la accesión número NR074403 del GenBank. Por lo tanto ratifica molecularmente la presencia de *X. albilineans* en la zona cañera de la Chontalpa, Tabasco. Siendo este el primer reporte de su presencia en la Chontalpa, Tabasco.

Palabras clave: Escaldadura, raquitismo, caña de azúcar

Diagnostic of *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson and *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane in the Chontalpa, Tabasco, México

ABSTRACT

Hermeregildo Salomón García Juárez, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2014

The leaf scald and the ratoon stunting disease is one of the most important disease due to the huge amount of losses caused worldwide, even though its presence has been indicated in Tabasco, it has not been confirmed. This is how the present work has been proposed in order to diagnose the presence and distribution of the bacteria *Xanthomonas albilineans* y *Leifsonia xily* subsp. *Xyli* causative agents of these diseases respectively. The research was done in the sugarcane area of the Chontalpa, Tabasco. For which sampling was conducted considering three factors: five clones (Mex 69-290, Mex 79-431, Mex 68-P-23, CP 72-2086 y RD 75-11); four types of soil (Cambisol, Vertisol, Gleysol, Fluvisol) and two precipitation regimens (1793-1936 mm y 1937-2085 mm); with three repetitions, that generated the observation of 105 plantations. The georeferencing of plantations were performed on the soil map and Thiessen polygons scale 1:50,000. Ten stems from different points were collected consistently from each plantation; in which juice was extracted from a nitrocellulose membrane and they were revealed by the method “Dot blot immunoassay”. The results show the presence of *X. albilineans* in three clones (Mex 69-290, Mex 68-P-23 y Mex 79-431); and for the de *L. xyli* subsp. *Xyli* in four clones (CP 72-2086, Mex 68-P-23, Mex 69-290 y RD-75-11); the distribution of both diseases is focused. At the same time, the *X. albilineans* bacteria was isolated from symptomatic plants for its molecular identification. This is how a fragment from 1392 pb from the region 16S rDNA was amplified and sequenced, obtaining a maximum identity (100%) with the accession number NR074403 del GenBank. Therefore, ratifies the molecularly presence of *X. albilineans* at the sugar cane are of Chontalpa, Tabasco. Since this is the first report of its presence in the Chontalpa Tabasco.

Keywords: leaf scald, ratoon stunting disease, sugarcane

1 INTRODUCCION

El cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) está considerado entre los cultivos agroindustriales de mayor importancia económica tanto a nivel mundial, como en México, debido a que es fuente de trabajo para miles de personas y generadora de divisas, y por sus altos volúmenes de producción y exportación. En México actualmente se cultivan alrededor de 780,254 ha, de las cuales, en el estado de Tabasco se cultivan 36,287 ha (INFO-CAÑA, 2014). A lo largo de la historia y en la mayoría de países productores de caña, los rendimientos en toneladas métricas de azúcar producido por año han aumentado, pero de igual manera el número de enfermedades que afectan los rendimientos del cultivo también han aumentado. Entre tales enfermedades se encuentran las causadas por bacterias, como son la escaldadura de la hoja y el raquitismo de las socas, cuyo agentes causales son *Xanthomonas albiliensis* (Xanthomonadales; Xanthomonadaceae) y *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, (Actinomycetales; Microbacteriaceae) respectivamente. Estas enfermedades bacterianas están consideradas entre las de mayor importancia económica del cultivo de caña de azúcar, debido a las enormes pérdidas que provocan a nivel mundial.

Ambas enfermedades por la naturaleza de su patógeno, afectan el sistema vascular de la planta, ubicándose en los vasos del xilema. Así, por el carácter sistémico de éstas provocan taponamiento del sistema vascular de la planta, afectando primeramente el transporte de agua y nutrientes; así como, el transporte y almacenamiento de los productos elaborados. Por lo anterior, la enfermedad escaldadura de la hoja, en su fase crónica provoca como síntomas la aparición de brotes laterales o lalas, a partir de la base del tallo hacia el meristemo apical, los cuales pueden mostrar, clorosis o marchitamiento, al igual que el follaje de la planta. En tanto que las plantas atacadas por la enfermedad del raquitismo de las socas muestran tallos más delgados y cortos que los de las plantas sanas; además, de provocar daños de mayor impacto en condiciones de estrés hídrico y elevada evapotranspiración.

La diseminación de ambas enfermedades se favorece en las siembras del cultivo, por el empleo de semilla vegetativa infectada, así como por el uso de herramientas infectadas al realizar la cosecha o corte de caña para semilla.

Teniendo en cuenta los medios de diseminación indicados, se han diseñado estrategias para el control de este tipo de enfermedad basados en el tratamiento térmico de la semilla con agua caliente (51°C por una hora) y la desinfección química de la herramienta empleada en el corte de la semilla con yodo al 5%; cuando la eliminación de la bacteria en la semilla vegetativa es incompleta, la enfermedad puede incrementarse nuevamente en campo y favorecer la diseminación en zafras posteriores. La idea fundamental de las estrategias de control está basado en la producción de semilleros certificados, con lo cual se tendría una menor incidencia de la enfermedad y de esta forma obtener campos comerciales con menor infección (Ovalle, 2012).

Considerando que a la fecha no existe un reporte oficial de la presencia de estas enfermedades en la zona productora de caña de azúcar de la Chontalpa, Tabasco, México; esta tesis tuvo relevancia en confirmar la presencia de los agentes causales de ambas enfermedades, y conocer su distribución, así como determinar cuáles, de los cinco principales clones comerciales cultivadas en el área de estudio están siendo afectadas por una u otra de estas enfermedades. A fin de recomendar las estrategias preventivas de manejo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Confirmar la presencia de las bacterias *Xanthomonas albilineans* y *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causantes respectivamente de las enfermedades escaldadura de la hoja y del raquitismo de las socas de la caña de azúcar, en la zona cañera de la Chontalpa, Tabasco, México.

2.2 Objetivos particulares

Determinar la distribución e incidencia de las bacterias *Xanthomonas albilineans* y *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* en el zona cañera de la Chontalpa, Tabasco, México.

Determinar en qué clones comerciales están presentes las bacterias *Xanthomonas albilineans* y *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* en la zona cañera de la Chontalpa, Tabasco, México.

3 HIPÓTESIS

Las bacterias *Xanthomonas albilineans* y *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* están presentes en la zona cañera de La Chontalpa, Tabasco, atacando diferentes clones comerciales.

4 REVISION DE LITERATURA

4.1 El cultivo de la caña de azúcar

La caña de azúcar (*Saccharum sp.*) económicamente es uno de los cultivos de mayor importancia en el trópico y sub trópico, principalmente por su alta productividad, su uso eficiente de insumos, y su facilidad de procesamiento como la de sus derivados (Moore, 2014). Es por ello que el cultivo de la caña de azúcar se realiza en más de 100 países, en una superficie de más de 20 millones de hectáreas y con una producción anual de 1,300 millones de toneladas (D'Hont *et al.*, 2008). Aunado a esto, la excepcional capacidad del cultivo para producir biomasa, indica que es una fuente importante de la misma. Lo cual es importante si consideramos que la economía mundial dependerá de una fuente de energía, siendo la biomasa una fuente de energía renovable, por lo que sustituirá parcialmente a la energía fósil (Botha, 2009). Una muestra de esto es que la caña de azúcar es la materia prima preferida para producción de etanol o generación de energía eléctrica y de otros coproductos como: bioplásticos y otros derivados de la sucroquímica (ISO, 2009).

En México la agroindustria azucarera está dividida en seis regiones productivas que integran a 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).

Esto es muestra de la importancia del cultivo, tanto por la superficie cultivada, como por la generación de empleo. Actualmente, el país reporta 780,254 ha cultivadas de caña de azúcar con un rendimiento promedio de caña de 75.63 t/ha; lo que ubica al país como en el sexto productor a nivel mundial. Además, provee alrededor de 450,000 empleos directos y beneficios directos a más de 2.2 millones de personas. (Salgado *et al.*, 2013)



Figura 1. Ingenios azucareros en México (INFOCAÑA, 2014).

En el estado de Tabasco se cultivan 36,287 ha de caña de azúcar con un rendimiento promedio de 56.47 t/ha, esta producción se da en dos zonas cañeras, La Chontalpa y Los Ríos. (INFO-CAÑA, 2014).

En la zona cañera de la Chontalpa, se encuentran ubicados dos ingenios azucareros; Presidente Benito Juárez con 18,360 ha y Santa Rosalía con 10,903 ha (INFOCAÑA, 2014) juntos representan más del 90% del área cultivada con caña de azúcar. En dicha región se cultivan principalmente cuatro clones en el 95% de la superficie dedicada a este cultivo: Mex 69-290, Mex 79-431, Mex 68-P-23 y CP 72-2086 (Salgado *et al.*, 2009) acción contraria a la tendencia mundial de no excederse más del 15% de la superficie cultivada con un solo clon. Además, se cultiva el clon RD 75-11 que se encuentra en expansión. Las características agronómicas de estos clones se describen en anexo 2.

La zona de abasto del Ingenio Presidente Benito Juárez está formada, de manera dominante, por tres grupos de suelos: Vertisoles (45.50 % de la superficie total), Cambisoles (38.55 %) y los Gleysoles (13.84%) (Salgado *et al.*, 2009). En tanto en la zona de abasto del Ingenio Santa Rosalía, el grupo de suelo predominante es el Fluvisol (Salgado *et al.*, 2004). Por otra parte, la precipitación, en las zona de abasto de ambos ingenios, se encuentra en un rango de 1640 a 2227 mm; abarcando la mayor parte de la superficie cultivada con caña de azúcar, una precipitación intermedia de 1793 a 1936 mm (Salgado *et al.*, 2009).

4.1.1 Descripción botánica

La caña de azúcar pertenece al género *Saccharum*, el cual a su vez es miembro de la tribu *Andropogonae* y de la familia *Poaceae*. Este género está constituido por seis especies, cuatro domesticadas (*S. officinarum*, *S. edule*, *S. barberi*, *S. sinensis*) y dos silvestres (*S. spontaneum*, *S. robustum*). En la actualidad, gracias al fitomejoramiento se cultivan cañas con tolerancia a enfermedades, buen contenido de azúcar, delgadas y hojas angostas, características extraídas de algunas de las cinco especies restantes, ya que el alto contenido de sacarosa solo lo posee la *S. officinarum* (D'Hont *et al.*, 1998).

4.1.2 Morfología de la planta

La anatomía y la morfología de la caña de azúcar están directamente asociada a su capacidad de sintetizar, transportar y acumular grandes cantidades de sacarosa, de la misma manera que ocurre en otros miembros de la familia *Poaceae*. La parte aérea está integrada por una serie de entrenudos que contienen las estructuras celulares especializadas para la transferencia y el almacenamiento de la sacarosa (Anne *et al.*, 2014). Amaya (1986), califica, agronómicamente al tallo como la parte más importante de dicha planta, ya que es sitio donde se almacena la sacarosa; además, cumple funciones de conducción de agua y nutrientes. Inicialmente, el tallo se desarrolla del meristemo apical y posteriormente, a partir de yemas axilares subterráneas del tallo principal surgen nuevos tallos; cada uno de los cuales establecerá sus propias raíces y capacidad productiva (Anne *et al.*, 2014).

El sistema radicular de la caña de azúcar es fibroso, de forma cilíndrica, que se adelgaza al punto de crecimiento; este le sirve a la planta para poder mantenerse anclada al suelo y abastecerse de nutrientes y agua que necesita para su desarrollo (Silva *et al.*, 2010). Dependiendo de la etapa fenológica en que se encuentra el cultivo se forman dos tipos de raíces. Las raíces primordiales nacen en cada uno de los nudos del tallo, desarrollándose cuando entran en contacto con la humedad del suelo, su período de vida es de aproximadamente 30 a 40 días (Amaya, 1986). Las raíces permanentes brotan de las macollas que se forman a partir de la semilla, se diferencian de las anteriores por ser más numerosas, gruesas y de crecimiento rápido, la profundidad que alcanzan las raíces dependerá del clon, textura y humedad del suelo (Romero *et al.*, 2009).

Las hojas brotan de forma alterna de los nudos del tallo, formando dos hileras opuestas en el mismo plano; estas son alargadas con bordes ligeramente dentados; el lugar donde se realiza la fotosíntesis es la lámina foliar, tienen una longitud de 0.90 a 1.50 m y un ancho de 0.05 a 0.10 m. Cada hoja está constituida por dos partes, la lámina y la vaina, además de la lígula o cuello de la hoja que tiene como función unir a las dos primeras. El color, ancho, contenido o no de pubescencia y turgencia, de la vaina son determinantes para la identificación de clones (Amaya, 1986) . La floración de la caña de azúcar es un factor que limita el crecimiento y tonelaje en los campos, ya que disminuye el contenido de sacarosa y aumenta el porcentaje de fibra. Silva *et al.* (2010) mencionan que la floración ocurre cuando se presentan condiciones ambientales tales como fotoperiodo, temperatura y humedad adecuados, variando la intensidad de floración de acuerdo al clon. Romero *et al.* (2009) indican que la inflorescencia de la caña de azúcar es una panícula de aspecto sedoso, formado por un eje principal, al cual están insertadas en pares las espiguillas, la flor es hermafrodita con tres estambres y un ovario con dos estigmas.

En la figura 2 se presentan las diferentes etapas fenológicas de la caña de azúcar y que de acuerdo con Rometo *et al.* (2009) son, las siguientes: emergencia y establecimiento de la población inicial de tallos (Brotación), Macollaje y Cierre del cañaveral, Determinación del rendimiento cultural y Maduración y definición de la producción de azúcar.

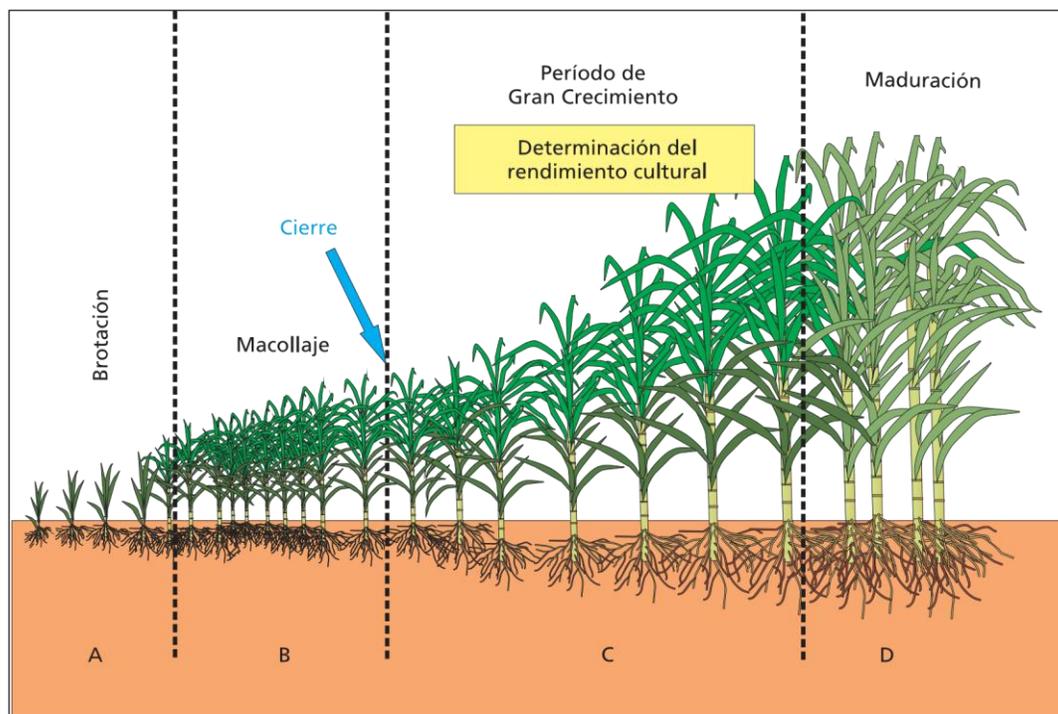


Figura 2. Etapas fenológicas del cultivo de la caña de azúcar, esquema tomado de Romero *et al.* (2009)

4.2 Enfermedades de la caña de azúcar

En el cultivo de la caña de azúcar están reportadas más de 126 enfermedades en 109 países (Chinea *et al.*, 2000). Salgado *et al.* (2013) y Silva (2013) mencionan que las enfermedades reportadas en México y que pueden causar daños económicos al cultivo de la caña de azúcar, son las siguientes y están ordenadas dentro de cada grupo de acuerdo a su grado de importancia. Causadas por virus: Síndrome de la hoja amarilla (SCYLV), Mosaico (SCMV); Causadas por bacterias: Escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans*), Raquitismo de las socas (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*), Raya roja (*Acidovorax avenae* subsp.

avenae=*Pseudomonas rubrilineans*), La Raya moteada (*Herbaspirillum rubrisubalbicans* = *Pseudomonas rubrisubalbicans*), La Gomosis (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vasculorum*); Causadas por hongos: Carbón (*Ustilago scitaminea*), Roya naranja (*Puccinia kuehni*), Roya café (*Puccinia melanocephala*), Pokkah boeng (*Fusarium moniliforme*), Mancha amarilla (*Mycovellosiella koepkei*), Mancha púrpura (*Dimeriella sacchari*), Muermo rojo (*Physalospora tucumanensis*), Mancha de ojo (*Bipolaris sacchari*), Mancha café (*Cercospora longipes*), Mancha de anillo (*Leptosphacteria sacchari*).

4.3 La escaldadura de la hoja

La escaldadura de la hoja de la caña de azúcar, es una enfermedad vascular ocasionada por la bacteria *Xanthomonas albilineans* (Ricaud y Ryan, 1989). Esta enfermedad, es de las más importantes en el cultivo, por sus efectos negativos en los rendimientos agrícolas, la calidad de los jugos y las elevadas pérdidas que ocasiona en su fase aguda, estimadas entre el 90 - 100% (Hoy y Grisham, 1994).

La escaldadura de la hoja, fue registrada por primera vez en la década de 1920, por las investigaciones de Wilbrink (1920) en Java, y Northh (1926) en Australia y Fiji, quienes trabajaron de forma simultánea pero independiente (Martin *et al.*, 1961; Ricaud y Ryan, 1989).

En México se detectó por primera vez el 17 de febrero de 1992 por personal del ingenio “El Modelo” y fue identificada como “escaldadura de la hoja” por el Dr. J. E. Irvine del “Texas Experiment Station”. Este hecho ocurrió en predios cercanos al Río la Antigua, Veracruz, sembrados con el clon Mex 64-1487 altamente susceptible (Parra, 1993). Flores, (1997) reporta que la escaldadura se encuentra presente en los estados de: Veracruz (en las áreas de influencia de los ingenios La Gloria, El Modelo, El Potrero y San Miguelito); Morelos (en el área de influencia de ingenio Emiliano Zapata) y Chiapas (en la estación de hibridación en Tuxtla Chico y en el área de influencia del ingenio Huixtla).

4.3.1 Agente causal

Según la clasificación actual de los seres vivos, el dominio Bacteria está dividido en 13 grupos, clasificados como reinos (Madigan *et al.*, 2000). El reino IV (Proteobacteria), contiene un gran número de bacilos y cocos Gram negativos y engloba a la mayoría de las bacterias fitopatógenas (Luz, 2000).

Según Domrachev *et al.* (2003) la posición taxonómica de *X. albilineans* es:

Dominio: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Xanthomonadales

Familia: Xanthomonadaceae

Género: *Xanthomonas*

Especie: *albilineans* (Ashby 1929) Dowson 1943.

4.3.2 Descripción morfológica

X. albilineans es una bacteria fitopatógena de la caña de azúcar, sistémica (Pieretti *et al.*, 2009). Es aerobia, hidroliza la esculina, no presenta actividad proteolítica, no puede utilizar las sales de amonio, puede utilizar nitratos o asparagina como fuentes de nitrógeno, no forma nitritos a partir de nitratos, produce invertasa pero no ureasa y requiere metionina para su crecimiento (Ricaud y Ryan, 1989). Tiene forma de bacilo, es gram-negativa, móvil, mide 0.4-0.9 x 0.7-2.0 μM , presenta un solo flagelo polar, en medio de cultivo de peptona y sucrosa forma colonias lisas, amarillas y no mucoides, mientras que en medio wilbrink agar y D-5, forma colonias amarillas, circulares, de bordes uniformes, de consistencia gelatinosa y aspecto brillante (Ordosgoitti *et al.*, 1977).

Esta bacteria, bajo condiciones naturales, solo ataca a la caña de azúcar, produciendo una toxina llamada albicidina, la cual es extremadamente eficiente en causar los síntomas de la enfermedad; esta toxina es el factor principal de patogenicidad en *X. albilineans* pero no es el único, esto se sabe porque existen cepas de la bacteria que no producen la toxina pero son capaces de colonizar los tallos de la caña de azúcar, tal como lo hacen las cepas que producen albicidina (Genoscope, 2008).

4.3.3 Sintomatología

La expresión de los síntomas y la severidad se asocian con el nivel de resistencia de los clones, las condiciones ambientales y la agresividad del patógeno (Lopes *et al.*, 2001). Las plantas infectadas por *X. albilineans* pueden presentar tres formas de respuestas sintomatológicas independientes: crónica, aguda y latente, lo que dificulta el diagnóstico de la enfermedad (Tokeshi, 1980).

4.3.3.1 La forma crónica

En clones susceptibles, esta forma se caracteriza por la presencia de líneas claras paralelas a las nervaduras, inicialmente estrechas, que gradualmente se extienden a lo largo del limbo (Figura 3a). El color de las rayas puede variar de blanco a amarillo tornándose violáceo cuando se prolonga sobre la vaina. Otro síntoma de esta forma es la aparición de brotes laterales en tallos molederos (Figura 3b), que se desarrollan desde la base o de la parte media del tallo hacia el ápice, los cuales por lo general disminuyen su tamaño conforme asciende a lo largo del tallo (Martin *et al.*, 1961). Los brotes laterales inducidos por la escaldadura también pueden o no mostrar clorosis o atizonamiento foliar. Por otro lado, el ataque de esta bacteria en cepas en desarrollo puede provocar hojas con rayas blancas o completamente etioladas (Martin *et al.*, 1961; Ovalle, 2012). Asimismo, Martin *et al.* (1961) señalan que internamente, los tallos infectados pueden presentar haces vasculares de color rojo claro que oscurecen con el tiempo (Figura 3c). El cambio de color se inicia en los nudos y se extiende hacia los entrenudos (Ovalle, 2012).



Figura 3. Planta y tejidos de caña de azúcar con infección natural de *X. albilineans* mostrando distintos síntomas externos e internos: **a.** línea de lápiz en limbo foliar; **b.** emisión de brotes laterales; **c.** sección interna del nudo mostrando cambio de coloración de los haces vasculares (Fotografías tomadas de Ovalle, 2012).

4.3.3.2 La forma aguda

En esta forma de ataque, las plantas pueden marchitarse súbitamente, los tallos cambian del color normal a un color rojo oscuro y mueren (Martin *et al.*, 1961; Ovalle, 2012). Es decir, plantas aparentemente sanas, y que súbitamente muestran las hojas totalmente secas, causando la muerte de la planta. Esta forma se produce después de episodios lluviosos seguidos de un período de sequía prolongado, aunque parece limitarse a clones muy susceptibles (Rott, 1995), así como en aquellos clones con resistencia intermedia, desarrolladas en condiciones extremadamente favorables para el patógeno (Tokeshi, 1997).

4.3.3.3 La forma latente

Esta forma se manifiesta principalmente en clones tolerantes. En este caso las plantas infectadas no manifiestan síntomas externos o raramente algunas líneas blancas. Las razones por las cuales se rompe el estado de latencia son desconocidas, pero se cree que se debe al estrés, ya sea climático o nutricional, que podría favorecer el desarrollo de la enfermedad (Tokeshi, 1997). Esta fase constituye uno de los principales retos en la lucha contra la enfermedad, ya que favorece la diseminación de la enfermedad con el uso de fuente de semilla vegetativa (tallos) aparentemente sana (Ricaud y Ryan, 1989).

Tokeshi (1997) describe una variante sintomatológica de la forma latente a la que denominó como eclipse; la cual, consiste en la aparición temporal de líneas foliares de color blanco, que dejan de ser visibles después de la senescencia y la muerte de las hojas más viejas, en tanto que las hojas nuevas presentan forma y coloración normal. Así, una planta infectada puede ser visualmente determinada de forma errónea como sana, según el momento de la inspección.

4.3.4 Transmisión de la enfermedad

La escaldadura de la hoja se transmite fundamentalmente por la siembra de tallos infectados, los instrumentos de corte y la maquinaria agrícola; aspectos en los cuales, la presencia de la enfermedad en fase latente constituye un factor fundamental de dispersión (Ricaud y Ryan, 1989). Casagrande *et al.* (1997) señalaron que el patógeno se puede transmitir a varias plantas por medio de los machetes y cosechadoras mecánica contaminada. Se ha demostrado además su transmisión de una planta a otra por contacto de los exudados de las raíces y a través del agua del suelo, aunque al parecer *X. albilineas* es incapaz de sobrevivir por largos períodos de tiempo en el suelo (Rivera, 1985). La bacteria puede encontrarse en la superficie de las hojas con síntomas y se ha señalado que también coloniza la inflorescencia de la caña, pudiendo diseminarse mediante la lluvia, el rocío, los insectos, el contacto entre las hojas y el aire (Klett y Rott, 1994).

4.3.5 Importancia económica de la enfermedad

El impacto económico de la escaldadura de la hoja es grave cuando resultan afectados clones susceptibles en las zonas de producción (Ricaud y Ryan, 1989), fundamentalmente cuando la enfermedad aparece por primera vez en un país, estado o región cañera o cuando una nueva cepa del patógeno es introducida en una zona ya contaminada (Rott, 1995).

Las plantaciones de clones susceptibles a la escaldadura pueden ser destruidas totalmente en unos meses o en años. Sin embargo, la caída del rendimiento más espectacular se observa después del desarrollo de la forma aguda (Rott, 1995). Las pérdidas directas se generan por la caída del rendimiento, debido a la reducción del crecimiento y el número de tallos, además influye negativamente en el desarrollo de los retoños y en la calidad del jugo; los estimados de pérdidas están entre 15 y 20%; sin embargo, en clones muy susceptibles, puede provocar daños severos estimados entre el 90 y 100% debido el marchitamiento completo de las hojas y pudrición de los tallos (Ricaud y Ryan, 1989; Rott, 1995). En clones tolerantes las pérdidas pueden estar entre el 10 al 15 % (Huerta *et al.*, 2003).

En Guadalupe, Francia, esta enfermedad disminuyó la producción en 13 t/ha (Cochereau y Jean-Bart, 1989), mientras en México, a la llegada en 1992 destruyó 800 ha del clon Mex 64-1487 y afectó el 25% del área cultivada con el clon Mex 69-290 (Rott, 1995; Flores, 1997). Asimismo, indujo la eliminación de más de 100 cepas de otros clones de los programas de mejoramiento genético en la Estación Nacional de Hibridación en Tapachula, Chiapas (Flores, 1997). De igual forma, la aparición de la enfermedad en Louisiana, USA provocó la pérdida de clones prometedores que estaban en selección y condujo a modificar las estrategias de mejoramiento genético (Hoy y Grisham, 1994). En ese sentido se ha señalado la vulnerabilidad que se tiene en la región cañera de la Chontalpa debido a la siembra de un gran número de hectáreas con clones clasificados como tolerantes.

Además, de las pérdidas directas, la Escaldadura de la hoja, causa pérdidas indirectas debido a los costos de replantación de las zonas destruidas, la producción de material sano (vitroplantas y termoterapia) y la selección de clones resistentes (Rott, 1995).

4.4 Raquitismo de las socas de la caña de azúcar

El raquitismo de las socas es causada por la bacteria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* y es una enfermedad considerada entre las de mayor importancia en el cultivo de la caña de azúcar, por sus efectos negativos en la producción (Davis, 1980). Fue reportada por primera vez en 1944 en Australia, en el clon Q 28; actualmente se ha reportado en la mayoría de las áreas productoras de caña de azúcar del mundo, como: Argentina, Brasil, Centro América, Colombia, Cuba, Fiji, Hawái, India, Indonesia, Jamaica, Kenia, Mauricio, México, Perú, Taiwán y Estados Unidos de América (Davis y Bailey, 2000). Flores (1997) reporta que el raquitismo de las socas fue detectada por primera vez en México en 1953. Sin embargo, se ha seguido cultivando intensivamente la caña de azúcar en el país sin la aplicación de medidas fitosanitarias para su combate.

4.4.1 Agente causal

La identificación inicial del agente causal fue difícil de lograr, debido a que durante muchos años la enfermedad era atribuida a un virus, ya que no se asociaba ningún microorganismo con la enfermedad. Sin embargo, el jugo de plantas enfermas mantenía su infectividad. Mucho tiempo transcurrió para definir que una bacteria corineforme, que habitaba en las células del xilema, era la responsable del raquitismo de las socas (RSD por sus siglas en inglés “Ratoon stunting disease”) (Davis, 1980). A la bacteria se le denominó *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* (Comstock, 2002). Posteriormente, este microorganismo fue reclasificado dentro del género *Leifsonia* porque está más estrechamente relacionado con los miembros de este género, conservando la especie y subespecie (Evtushenko *et al.*, 2000).

Leifsonia xyli subsp. *xyli*, pertenece al orden *Actinomycetales*, que incluyen bacterias como *Mycobacterium tuberculosis*, agente causal de la tuberculosis humana, *Bifidobacterium longum*, un habitante de la flora intestinal humana y especies del género *Streptomyces*, fitopatógenos de poca importancia (Locci, 1994). El género *Leifsonia* posee siete especies que habitan en distintos ambientes. Dentro de la especie de *L. xyli* existen dos subespecies denominadas *L. xyli* sub especie *xyli* y *L. xyli* subespecie *cynodontis*. La subespecie *cynodontis* afecta a las gramíneas y causa raquitismo en grama Bermuda. En experimentos de investigación esta subespecie fue capaz de colonizar los vasos del metaxilema de todas las plantas inoculadas (Locci, 1994).

4.4.2 Descripción morfológica

L. xyli subsp. *xyli* es una bacteria gram positiva, corineforme, no móvil, aeróbica, se divide por fisión binaria transversal, presenta mesosomas y es parásito obligado que coloniza el xilema de la planta; tiene un largo de 1.0 a 3.5 micras y su ancho de 0.2 a 0.3 micras (Comstock, 2002). Esta bacteria presenta una pared celular delgada y pareja, las células pueden ser rectas, curvadas o hinchadas en los extremos o por la mitad. La bacteria usualmente contiene mesosomas lamelares (Davis, 1980).

4.4.3 Sintomatología

Los únicos síntomas asociados con el raquitismo de las socas es la disminución del diámetro de los tallos, y el acortamiento de los entrenudos (Figura 4a). Esto hace que ésta sea una de las enfermedades más difíciles de diagnosticar. Se menciona que dichos síntomas es resultado del taponamiento vascular; sin embargo, se desconoce si la obstrucción es causada por algún metabolito producido por la bacteria, una respuesta de defensa de la planta o una combinación de ambos (Gillaspie y Teakle 1989). Aunque no es generalizado, Ovalle (2012) reporta que en cortes longitudinales de tallos de ciertos clones atacadas por raquitismo presentan como síntoma internos pequeñas líneas (1-2 milímetros) de color rojizo en las bases de los entrenudos (Figura 4b). Además, señala que en las plantaciones infectadas ocurre una reducción progresiva del rendimiento de campo, a través de las zafras;

debido a que la enfermedad, reduce el vigor y el número de los tallos, y es lo que dio origen al nombre de raquitismo de la socas a dicha enfermedad.

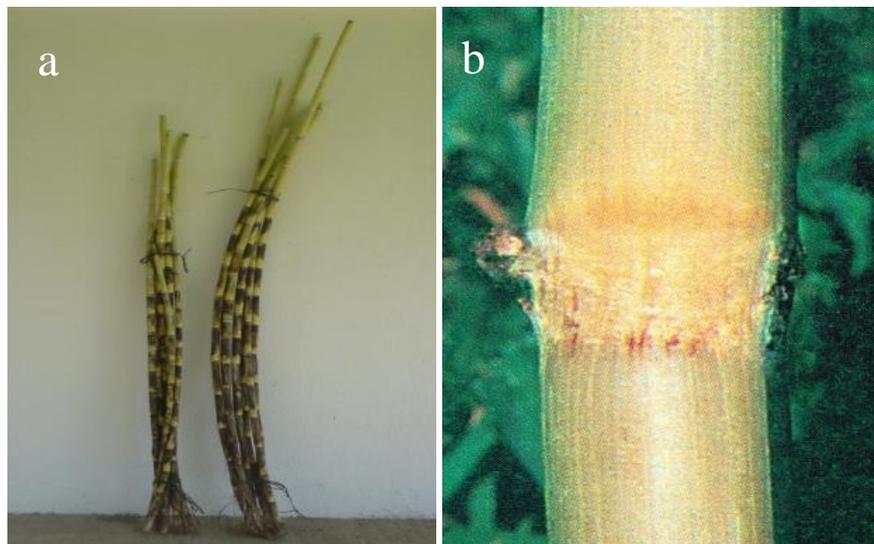


Figura 4. Detalles de los efectos de *L. xyli* en el clon CG98-62: **a.** Efecto de la infección por *L. xyli* en los tallos; **b.** Líneas de color rojizo en la base de un nudo de un tallo infectado (Fotografías tomadas de Ovalle, 2012)

4.4.4 Transmisión de la enfermedad

La enfermedad del raquitismo de las socas se propaga principalmente a través de tallos infectados utilizados como semilla, así como, del uso de herramientas de corte y las cosechadoras contaminadas. Se ha demostrado que una herramienta o equipo infectado puede diseminar la bacteria en 4 a 7.5 m (Hoy *et al.*, 1999). Por lo tanto la desinfección de las herramientas de corte y la maquinaria puede reducir la incidencia y la propagación de la bacteria (Davis y Bailey, 2000). Sin embargo las plantas infectadas que están dispersas en la plantación ya sean mezclas de otro clon o plantas provenientes de semilla infectada, contribuyen a la transmisión de la enfermedad. Los resultados de un experimento realizado en Sudáfrica demostró la magnitud del problema. Plantas infectadas se plantaron en intervalos de 2 m dentro de una plantación sana, del clon NCo 376. Se evaluaron tres frecuencias de desinfección de las herramientas (sin desinfección y con desinfección a intervalos de 1 y 4 m). Sin la desinfección de la herramienta de corte, la incidencia de RSD en

el clon NCo 376 aumento de cero en el primer corte a 63% en el segundo ciclo de corte (Comstock, 2002). La desinfección de las herramientas de corte al intervalo de 1 m fue efectivo para evitar la diseminación de la enfermedad, en tanto la desinfección al intervalo de 4 m resulto con incidencias del 35% de la primera cosecha a la segunda, sin embargo el clon NCo 376 es susceptible a la enfermedad y esto probablemente contribuyó al problema (Comstock, 2002).

4.4.5 Importancia económica de la enfermedad

La enfermedad del raquitismo de las socas es considerada una de las principales enfermedades de la caña de azúcar, si no la más importante económicamente (Davis y Bailey, 2000). Lo anterior debido a su amplia distribución y probablemente esté presente en casi todos los países cultivadores de caña de azúcar; además, las pérdidas en rendimiento varían, dependiendo del clon, de las condiciones climatológicas y del grado de infección. Las pérdidas de producción son más altos en periodos de sequías y condiciones de estrés (Comstock, 2002). Las pérdidas generales en toneladas por hectárea de clones de caña de azúcar susceptibles al raquitismo de las socas varían de un 35.4% en el clon CP 44-101 a un 12.7% en el clon CP 52-68; y aparentemente, el efecto sobre el contenido de azúcar es reducido. Los experimentos conducidos en Queensland, Australia, con el clon altamente susceptible Q 28, demuestran pérdidas de un 37% en el ciclo de caña de plantilla y un 67% en las cañas de primera soca; estudios subsiguientes, con un número mayor de clones, demostraron que las pérdidas varían de un 10 a 15% en plantaciones de ciclo plantilla y de un 20 a 25% en plantaciones de socas (Davis *et al.*, 1984).

Otro estudio conducido en CENGICAÑA, Guatemala con un grupo de clones promisorias demostró que las pérdidas fueron diferentes dependiendo del clon, lo cual muestra que existe variabilidad en la tolerancia a la infección por la bacteria causante del raquitismo de las socas. Las pérdidas en producción fueron igualmente mayores en las socas que en el ciclo de plantilla y en general ocurrió un incremento en pérdidas conforme se avanzó en los cortes. Las pérdidas causadas por el raquitismo de las socas en los clones evaluados, ocurren por disminución en las

alturas de planta y disminución en los diámetros de los tallos, lo cual provoca disminuciones en el peso de caña (Ovalle *et al.*, 2008). En este estudio, de los nueve clones evaluados, por un periodo de cinco años, ocho mostraron pérdidas en rendimiento promedio, en un rango entre 2.9 y 38.2 %. En términos absolutos el clon con el efecto más severo fue la CG 96-135 la cual tuvo una disminución promedio de 38.25 toneladas de caña por hectárea que equivale a un 28% de su producción promedio (Ovalle *et al.*, 2008). En general las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad van desde 0 hasta el 30% tal como se muestra en la Cuadro 1, que integra los resultados de experimentos conducidos en diferentes países (Comstock, 2002).

Cuadro 1. Reportes de pérdidas ocasionadas por la enfermedad del raquitismo de las socas en diferentes localidades (Comstock, 2002).

País	Rango de pérdidas	Tipo de experimento	Observación	Referencia
Brasil	0 - 32%	Rep. 3 ciclos	10 clones	Anónimos (1992/1993)
Sur África	1 - 41%	Rep. 3 ciclos	Ensayos múltiples	Bailey y Bechet (1997)
USA (Florida)	5%	Rep. 3 ciclos	4 clones y 4 localidades	Dean y Davis (1990)
USA (Louisiana)	14 - 27%	Rep. 3 ciclos	8 clones	Grisham (1991)
USA (Florida)	8 - 23%	Rep. 1 ciclo	Experimento único	Dean (1983)
USA (Louisiana)	2 - 24%	Rep. 2 ciclos	4 experimentos	Koike (1982)

Otro impacto económico de la enfermedad es el costo de los programas de control y que debe deducirse de los rendimientos brutos de la cosecha ya sean estos eficaces o no (Comstock, 2002).

4.5 Manejo de las enfermedades bacterianas en la caña de azúcar

Entre las enfermedades que se consideran de difícil erradicación, se encuentran aquellas que son transmitidas por la semilla vegetativa (agámica), como las enfermedades bacterianas, escaldadura de la hoja y raquitismo de las socas de la

caña de azúcar. Ambas, favorecidas por la permanencia de la plantación por varios años en una misma área (Frison y Putter, 1993). Cuando la enfermedad no está presente en una zona geográfica, las medidas de exclusión relacionadas con la cuarentena externa son las más indicadas. Así, el intercambio seguro de material vegetal, en especial de los tallos, y semilla biológica, constituye un aspecto clave (Frison y Putter, 1993).

En las zonas ya afectadas, el uso de clones resistentes o tolerantes es lo más adecuado; además, del uso de tallos sanos para la siembra (Ovalle, 2012). Para la obtención de material sano o libre de la enfermedad, se utiliza el tratamiento hidrotérmico (Frison y Putter, 1993). Existen varios tratamientos hidrotérmicos, estos elevan la temperatura en el tallo de la caña de azúcar durante un período de tiempo, que mata las bacterias en las células del xilema pero no daña las yemas; estos tratamiento incluyen aire caliente, la aireación de vapor y tratamientos de agua caliente (Davis y Bailey, 2000). China y Rodríguez (1994) mencionan que el tratamiento hidrotérmico de la semilla, a una temperatura de 50.5°C durante dos horas, después sumergirla inmediatamente en agua a temperatura ambiente durante 2.5 a 3 horas, contribuyen a la eliminación de la bacteria. Victoria *et al.* (1997) mencionan que el sistema más efectivo en el control del raquitismo de las socas es con tratamiento previo de la semilla en agua a 50°C durante 10 minutos, seguido de un periodo de reposo de 8 a 12 horas a temperatura ambiente, posteriormente un nuevo tratamiento en agua a temperatura de 51°C durante una hora. Técnicas de cultivo de tejidos también se han utilizado en programas de control de esta enfermedad (Hoy y Flynn, 2001). El cultivo de tejido de meristemo puede ser utilizado para limpiar las plantas infectadas. A menudo, las plantas sanas, obtenidos a partir de termoterapia, se utilizan como fuente de tejidos para la micropropagación de plántulas. Estas medidas deben ser complementadas con otras profilácticas como la eliminación del material enfermo y la desinfección de los instrumentos de corte por inmersión en un producto bactericida (Rott, 1995).

4.6 Diagnóstico de enfermedades

Para el adecuado manejo de alguna enfermedad es necesario conocer la etiología de la misma, para ello además de conocer los síntomas, contar con métodos de diagnóstico que permitan establecer el grado de importancia del brote en campo y establecer medidas de control adecuadas, es de suma importancia (Ovalle, 2012). Existen varios procedimientos para determinar la etiología de la enfermedad en la planta; tales como, la observación directa del agente causante al microscopio compuesto, técnicas inmuno-enzimáticas, bioquímicas y moleculares, y microscopía electrónica (Agrios, 2005). Para el diagnóstico de la escaldadura de la hoja y el raquitismo de las socas en caña de azúcar, se ha empleado principalmente las técnicas de microscopía, inmuno-enzimáticas y más recientemente las moleculares, debido a su difícil detección. Además de que la frecuente aparición de infecciones latentes limita en gran medida la utilidad de diagnóstico tradicional. Además, la naturaleza fastidiosa de los patógenos limita el uso del aislamiento en medio de cultivo. Para superar estos problemas, se han adoptado métodos serológicos (inmunofluorescencia, ELISA) y moleculares (PCR reacción en cadena de la polimerasa) para la detección y la identificación de estos patógenos (Rott y Davis, 2000).

4.6.1 Técnicas serológicas o inmunoquímicas

La reacción antígeno-anticuerpo es la base del inmunodiagnóstico, en fitopatología, estas técnicas ofrecen considerables posibilidades y ventajas para diagnosticar la causa de una enfermedad, así como identificar y caracterizar los fitopatógenos (Batista *et al.*, 2008). Se han desarrollado diversos métodos sobre la base de las características de la reacción inmune y las propiedades físico-químicas de los antígenos y anticuerpos, con la finalidad de detectar la presencia de los patógenos. En el cultivo de la caña de azúcar Comstock e Irely (1992) compararon diferentes métodos de diagnóstico (TBIA, ELISA, aislamiento) para diagnosticar *X. albilineans* en diferentes puntos del tallo; determinando que el mejor punto de muestreo es el tercio superior del tallo, tanto en plantas sintomáticas como asintomáticas, de igual

manera lograron una frecuencia de detección de 67.0, 90.4, y 98.9% en tallos sintomáticos con las técnicas de aislamiento, ELISA, TBIA, respectivamente. Alvez *et al.* (2011), señalaron que sin minimizar la importancia de otros métodos convencionales de detección como la microscopia y el aislamiento de los patógenos, es necesario implementar métodos más sensibles, rápidos y confiables que permitan detectar tempranamente la presencia del agente causal de la enfermedad a partir del jugo de la caña, sin necesidad de realizar el cultivo de la bacteria, que tardan alrededor de 17-20 días, además de la complejidad que implica por el carácter fastidioso de la misma; por tal motivo se han empleado métodos inmunoenzimáticos, muy confiables en la detección de pequeñas concentraciones de antígenos proteicos. Rao y Singh (2000) mencionan que la técnica DAC-ELISA es una técnica fiable para el diagnóstico del raquitismo en los clones infectados, además de su utilidad para la detección rápida de la enfermedad en las estaciones cuarentenarias.

Las técnicas serológicas son eficientes en detectar patógenos sistémicos como la escaldadura de la hoja en plantas asintomáticas, si la concentración de la bacterias esta alrededor de 10^5 ufc/mL⁻¹ de jugo (Wang *et al.*, 1999); concentración que también es reportada para el raquitismo de las socas (Comstock, 2002).

4.6.2 Técnicas moleculares

Las técnicas basadas en los ácidos nucleicos (DNA) han demostrado ser más sensibles, específicos y confiables para la detección, identificación y cuantificación de patógenos bacterianos en las plantas (Narayanasamy, 2011). Se han desarrollado diferentes metodologías, siendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) una de las herramienta de diagnóstico más ampliamente empleada, por sus grandes ventajas, como la sensibilidad de detección; por ejemplo, un ensayo basado en PCR fue capaz de detectar de manera eficiente el patógeno *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, agente causal del tizón del halo en frijol, con un límite de detección de 1-5 ufc/mL (Prossen *et al.*, 1991).

El uso de esta técnica para el diagnóstico *X. albilineans* y *L. xyli*, en el cultivo de caña de azúcar se incrementó dada su rapidez, sensibilidad y especificidad, los primeros iniciadores para el diagnóstico de *X. albilineans* fueron los propuestos por Honeycutt *et al.* (1995) quienes diseñaron los iniciadores ALA4, ILE2 que amplifican un segmento de 70 pb. Además, Pan *et al.* (1997) propusieron el uso de los iniciadores Ala4 y L1 que permiten amplificar un fragmento de 360 pb de la región ribosomal 16S/23S. 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. Pant *et al.* (1999) señalaron que, 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.

Por otra parte la identificación de *L. xyli* subsp. *xyli* como el agente causal del raquitismo de las socas en la década de los ochenta facilitó en gran medida el desarrollo de las pruebas serológicas (Davis *et al.*, 1984) y las pruebas de diagnóstico basadas en el DNA (Brumbley, 2006). Entre los métodos de detección basados en el DNA están, PCR convencional (Pan *et al.*, 1998); y PCR en tiempo real (Grisham *et al.*, 2007). Sin embargo se reporta que la PCR convencional es menos sensible cuando se aplican directamente al jugo de la planta, debido a sustancias inhibitoras desconocidas (Gao *et al.*, 2008). Actualmente, la detección por PCR de *L. xyli* subsp. *xyli* se basa en muestras de DNA extraídas de la savia del xilema o tejido de caña de azúcar usando un procedimiento CTAB (Shen *et al.*, 2006); sin embargo, este procedimiento requiere de tiempo y el uso de disolventes orgánicos, por lo que es limitado si se quiere realizar un diagnóstico en campo a gran escala (Gao *et al.*, 2008)

5 MATERIALES Y METODOS

5.1 Área de estudio

El presente estudio, se llevó a cabo en la zona productora de caña de la Chontalpa, en estado de Tabasco ubicada entre las coordenadas 17° 15' y 17° 40' de LN, 90° 59' y 94° 06' de longitud oeste del meridiano de Greenwich. Esta zona cuenta con un clima cálido húmedo [Am(i')g], promedios anuales de temperatura y precipitación de 26 °C y 2163 mm, respectivamente (Salgado *et al.*, 2009).

5.2 Diagnóstico y determinación de la distribución de la enfermedad

5.2.1 Puntos de muestreo

Para determinar la presencia de ambas bacterias en el área de estudio se realizó un muestreo dirigido a sondear la heterogeneidad ambiental considerando tres factores fundamentales: los cinco clones comerciales mayormente sembradas en la zona de estudio (Mex 69-290, Mex 79-431, Mex 68-P-23, CP 72-20-86 y RD 75-11), tres tipos de suelos (Cambisol, Vertisol y Gleysol) en dos régimen de precipitación (1793-1936 mm y 1937-2085 mm) y con tres repeticiones para cada conjunto de condición, lo que generó la toma de muestras en 90 plantaciones. La determinación de los puntos de muestreo y su distribución en el área de estudio se realizó utilizando la herramienta Arc.GIS versión 9.3 y los plano de estudio edafoclimatico regional (Figura 5). La georreferenciación de las plantaciones seleccionadas se realizó sobre el mapa de suelos escala 1:50,000 desarrollado en los estudios complementarios del SIRDF de la región cañera de la zona Chontalpa (Salgado *et al.*, 2009).

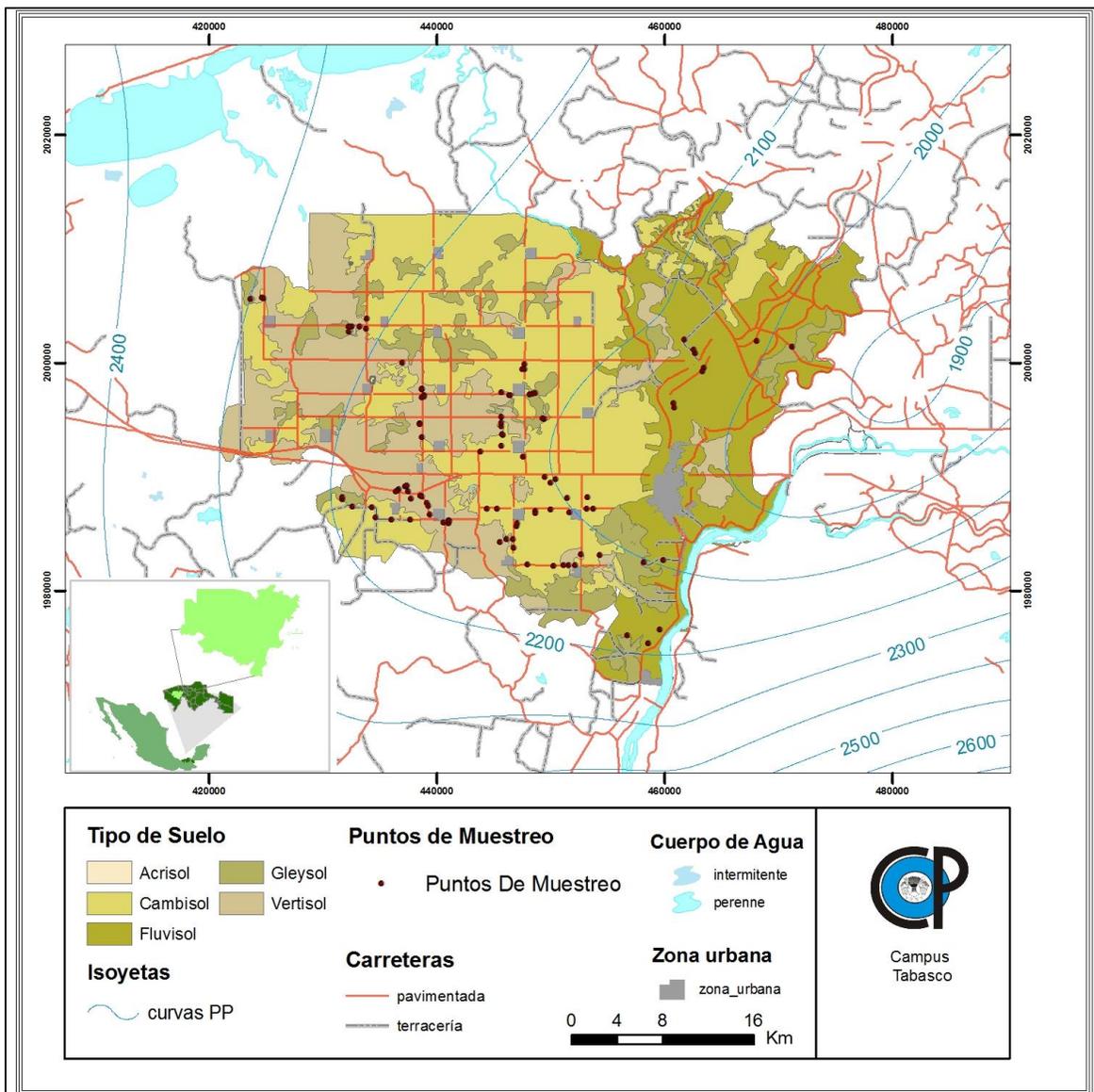


Figura 6. Distribución de los 105 puntos de muestreo en la zona cañera de la Chontalpa, del estado de Tabasco.

5.2.2 Toma de muestras

Con el apoyo de un GPS (Garmin *GPSmap 62*) se ubicaron las plantaciones correspondiente a cada sitio de muestreo predeterminado, verificando que la edad mínima de la plantación fuese de siete meses, es decir no antes de la etapa fenológica de macollamiento. En cada sitio se colectó de forma sistemática 10 tallos de cepas diferentes (Figura 7a), sin hacer distinciones entre tallos primarios y

secundarios. De cada tallo seleccionado se tomaron dos secciones de 30 cm de largo (Figura 7d): la sección apical para el diagnóstico de *X. albilineans* (Figura 7b), y la sección basal para el diagnóstico de *L. xyli* subsp. *xyli*, (Figura 7c).

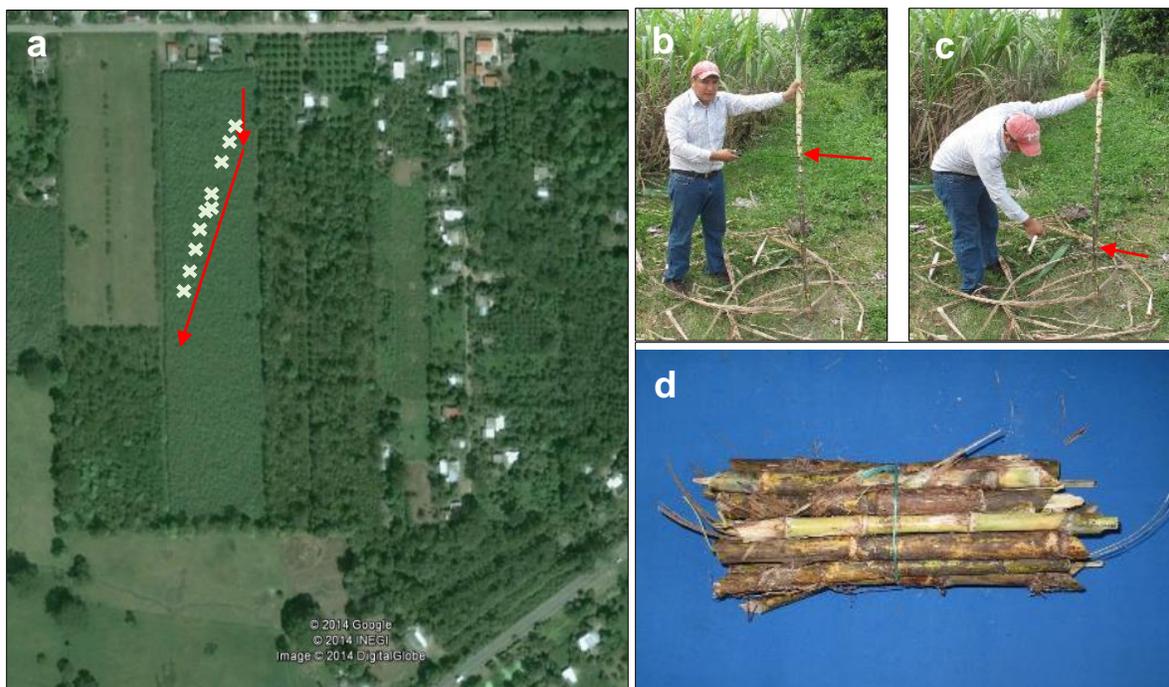


Figura 7. Secuencia de muestreo de tallos: **a.** Recorrido diagonal realizado durante el muestreo sistemático; **b.** sección de tallo colectado para la detección de *X. albilineans*; **c.** sección de tallo colectado para la detección de *L. xyli* subsp. *xyli*; **d.** muestra de 10 secciones de tallo de caña de azúcar.

Las muestras fueron trasladadas al laboratorio de fitopatología del Campus Tabasco, para la extracción de jugo, en condiciones asépticas, ejerciendo presión positiva sobre un entrenudo, empleando un dispositivo integrado a un compresor (Figura 8a). El jugo fue recibido en una tapa de caja Petri estéril y de ahí se depositaron 2.5 μ l del jugo sobre una membrana de nitrocelulosa (Millipore 0.45 μ m Cat.No. HAWG047S6) que previamente fue identificada con el número de muestras así como con el clon, el tipo de suelo y el régimen de lluvia (Figura 8b, 8c, 8d).

Cada membrana fue completada con muestras de suspensión bacteriana o testigos positivos, así como de testigos negativos como indicadores de la fiabilidad de los resultados. Así finalmente las muestras se fijaron en la membrana, mediante calor seco (70 ± 1 °C) ejercido por una hora con la ayuda de un horno (RIOSSA H-33) (Figura 8f).

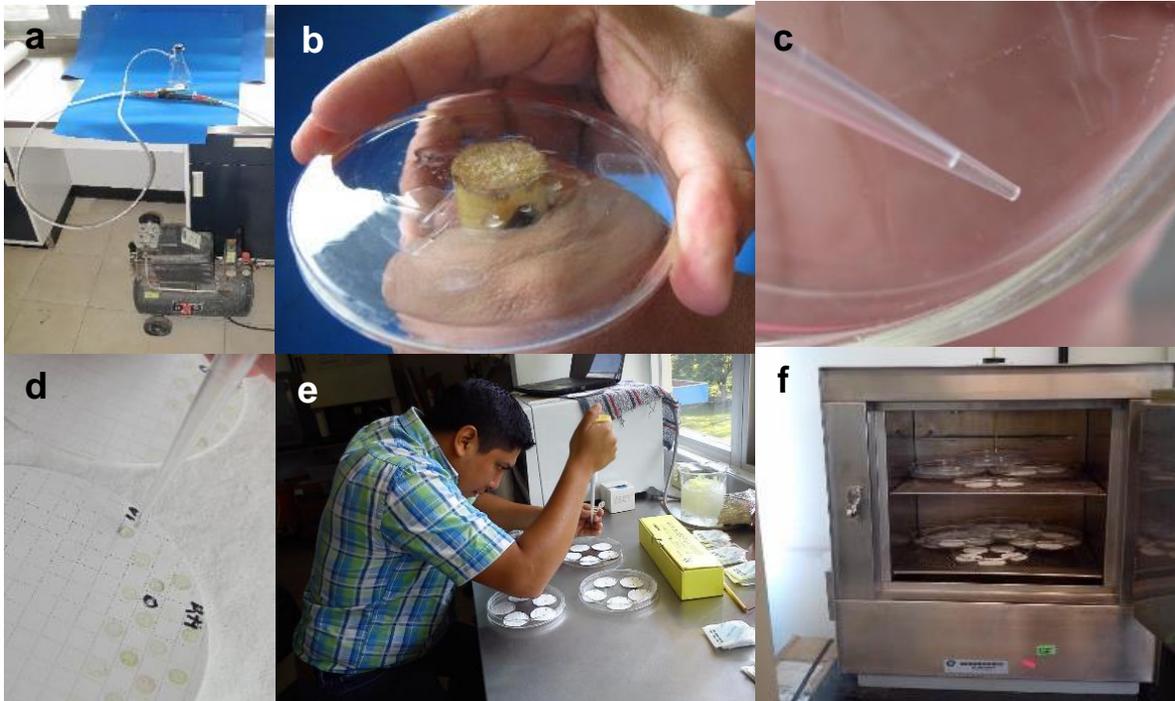


Figura 8. Secuencia de extracción de jugo de los tallos e impregnado en membranas: **a.** Dispositivo utilizado para la obtención de jugo; **b.** Jugo obtenido a 80 psi de presión; **c.** 2.5 μ l de jugo en punta de una micropipeta; **d.** deposición de jugo en membrana de nitrocelulosa. **e.** colocación de los testigos positivos y negativos; **f.** Proceso de fijación de las muestras a la membrana mediante calor seco a 70 ± 1 °C.

5.3 Análisis serológico

Todo el procedimiento se realizó en agitación suave (50 rpm) y a temperatura ambiente siguiendo la metodología descrita por Harrison y Davis (1988), modificado.

5.3.1 Saturación de la membrana con lactosa.

Con la finalidad de fijar con proteína de lactosa los espacios libres de jugo de caña impregnado en cada celda de la membrana, cada membrana fue depositada por 1 h en caja Petri estéril que contenía 10 mL de solución TBS (Tris HCL 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.5), enriquecida con 2% (w/v) de leche en polvo descremada. Posteriormente, las membranas se enjuagaron durante 1 min inmerso en 10 mL de la solución TBS.

5.3.2 Primer anticuerpo

Las membranas inmersas en 10 mL de solución TBS enriquecido con 1% (w/v) de leche en polvo descremada, a la cual se le adicionó el primer anticuerpo anti-X.a. IgG Policlonal para *X. albilineans* y anti-Lxx. IgG Policlonal para *L. xyli* subsp. *xyli*; a una concentración de 1:5000; durante 1 h. Posteriormente las membranas se lavaron tres veces en 10 mL de la solución TBS, durante 5 min.

5.3.3 Segundo anticuerpo

Posterior a los lavados, las membranas se incuban nuevamente en una solución TBS con 1% (w/v) de leche en polvo descremada, a esta solución se le agregó el anticuerpo secundario cabra IgG anti-conejo conjugado con Fosfatasa alcalina a una concentración de 1:10000 durante 1 h. Al finalizar este paso, las membranas fueron lavadas con la solución TBS, utilizando 10 mL por plato, durante 15 min, repitiendo este procedimiento dos veces. Todos los pasos desarrollados se realizaron con el objetivo de fijar los anticuerpos de *X. albilineans* y *L. xyli* subsp. *xyli*, en las celdas donde hubo presencia de las bacterias.

5.3.4 Sustrato de trabajo

La preparación del sustrato de trabajo se realizó a partir de la solución madre del sustrato (Tris base 0.2 M, pH 9.1, más 0.3 g Naftol-AS-fosfato disuelto en 5 mL de Dimetilformamida) de esta solución se tomaron 10mL por cada plato, a los que se les adicionó 0.01 g de Fast Blue y 0.05 mL de una solución de MgCl₂ 0.1M. Todo esto realizado en recipiente ámbar y en la cámara de extracción de gases.

5.3.5 Revelado de membranas

Las membranas se incubaron en 10 mL del sustrato de trabajo, en oscuridad y en agitación suave durante 20 min. Transcurrido este tiempo las membranas se lavaron con abundante agua destilada. Posteriormente, las membranas se sumergieron en una solución blanqueadora de cloro a una concentración de 1.31% por 10 min. Pasado este tiempo, las membranas fueron enjuagadas nuevamente con agua destilada. Finalmente se dejaron secar entre papel filtro.

Los espacios de las muestras sobre la membrana que mostraron color azul sobre la membrana, fueron el indicador de la presencia de la bacteria causante de la escaldadura de la hoja y se identificaron como muestras positivas.

5.4 Aislamiento de *Xanthomonas albilineans*

5.4.1 Toma de muestras de material vegetal

Se colectaron muestras de tejido foliar de los clones EMEX 00-21 y CXZ 75-644 con síntomas de línea de lápiz (rayas paralelas a la nervadura) característicos de la enfermedad, a partir de los cuales se realizaron los aislamientos. Estas muestras fueron colectadas en una zona, en la cual en un muestreo previo, había sido analizada y detectada positivamente para escaldadura de la hoja mediante análisis serológico. En el sitio se colectaron hojas de diferentes macollas con el síntoma de línea de lápiz bien definido, para ello se tuvo el cuidado de desinfectar el material de corte con un flameado con alcohol al 95% para evitar la diseminación de la enfermedad. Las muestras fueron depositadas en bolsa de polietileno, etiquetada y puesta en una nevera para su traslado al laboratorio.

5.4.2 Aislamiento

Para aislar la bacteria se utilizó el método de Deán (2004), el cual se realiza a partir de muestras de hojas con síntomas de líneas de lápiz, típico de la fase crónica. Primeramente, en el laboratorio se lavaron las hojas con abundante agua y jabón, con el fin de eliminar contaminantes superficiales. Así, se seleccionaron las muestras de hojas con síntoma bien definido y con la ayuda de una navaja se cortaron fragmentos rectangulares de 0.2 cm por 15 cm, conteniendo al centro la línea de lápiz. Después, a dichas muestras se le cortaron pequeños fragmentos de 0.2 cm de largo y se colocaron en un porta-objetos con una gota de agua destilada, para observar la presencia de flujo bacteriano, con la ayuda de un microscopio compuesto de contraste de fases. Posteriormente, los cortes positivos, con flujo de bacterias, se fraccionaron en trozos de 3 cm, cuyos borde cortados fueron sellando con barniz para uñas. En la cámara de transferencia de flujo laminar los trozos de hoja sintomáticos se desinfectaron, sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante 5 min y luego se lavaron tres veces en agua destilada estéril. Posteriormente, se toman los trozos de hoja con la ayuda de una pinza estéril, y se eliminaron los bordes con una tijera y se cortó en pequeños trozos (aproximadamente un mm de largo) sobre dos porta-objetos colocados en cruz dentro una caja Petri. Sobre el porta-objetos se agregó previamente 330 μ L de agua estéril. Se dejó en reposo por 5 min para permitir el exudado de *X. albilineans*, luego se recolectó la suspensión bacteriana con una pipeta Pasteur estéril y se sembró en cajas Petri con medio Agar-nutritivo, colocando cinco gotas sobre el medio nutritivo y se distribuyó utilizando una varilla doblada de acero. Las cajas Petri se sellaron con parafilm y se dejaron en incubadora a 30 °C, en oscuridad, por un periodo de 10 días.



Figura 9. Secuencia fotográfica del aislamiento de *X. albilineans*: **a.** Colecta de material vegetativo; **b.** Sintoma de la forma crónica conocido como línea de lápiz; **c.** Flujo bacteriano observado en un microscopio de contraste de fases; **d.** Desinfección del material vegetativo con hipoclorito al 3%; **e.** corte de muestras en porta objetos en cruz; **f.** siembra en medio de cultivo Agar Nutritivo.

5.5 Identificación molecular de los aislamientos

La identificación de agente causal se realizó mediante las técnicas moleculares descritas para aislamientos de bacterias las cuales se describen a continuación.

5.5.1 Extracción de DNA

La extracción del DNA se realizó con colonias puras de la bacteria, siguiendo el procedimiento que se describe a continuación: se colocaron en tubos eppendorf de 2 mL al que se le agregó 1000 μ L de CTAB al 2% de acuerdo al protocolo propuesto por Doyle y Doyle (1990). Los tubos se colocaron durante 1 h a 80 °C, cada 10 min se mezclaron en vórtex (Agitador Genie 2T, USA), posteriormente se centrifugaron a 10 000 xg por 5 min. Se tomó el sobrenadante y se colocó en tubos nuevos de 1.5 mL, se agregó 700 μ L de cloroformo-álcool isoamílico (24:1), este procedimiento se repitió dos veces. Después de centrifugarlos a 10 000 xg el sobrenadante se colocó en tubos nuevos de 1.5 mL al que se adicionaron 600 μ L de etanol absoluto frío y se colocaron a -20 °C por 2 h. Posteriormente se centrifugaron a 10 000 xg por 30 min, se decantaron y se les adicionaron 500 μ L de isopropanol al 70%. Enseguida se centrifugó a 10 000 xg por 10 min, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente por 1 h. La pastilla se disolvió adicionando 50 μ L de H₂O HPLC, se colocó durante 3 min en baño maría a 60 °C, enseguida se centrifugó a 10 000 xg por 5 min. Se tomaron aproximadamente 30 μ L de la parte superior de la muestra para cuantificar la calidad del DNA en un espectrofotómetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific, USA). Se prepararon diluciones a una concentración de 20 ng μ L⁻¹. Las muestras del DNA se conservaron a -20 °C.

5.5.2 Amplificación por PCR del loci ribosomal 16S

La mezcla de reacción para PCR se preparó para un volumen final de 25 μ L con 0.3 unidades de la enzima *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen, USA), 0.8 mM deoxinucleósido trifosfatos, 100 ng de DNA, 20 pM de cada iniciador y 5X *Taq* DNA Reaction Buffer (Promega, USA). Las amplificaciones se realizaron en un Thermal Cycler DNA Engine (BioRad, México), con un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 2 min para desnaturalización a 95 °C, un alineamiento a 59 °C por 1 min, y una extensión a 72 °C por 1.5 min, una extensión final a 72 °C por 5 min, esto para. Para verificar los productos de PCR se realizó

una electroforesis en gel de agarosa (Seakem, Switzerland) al 1.5% con 1X TAE buffer (Tris-Acetate-EDTA) al que se adicionó 5 μ L de gel red (Biotium, USA) durante 1.5 h a 110 volts. Al inicio del gel se colocó el marcador de peso molecular de 1kb (Promega, USA), las bandas se visualizaron en un transiluminador Infinity-3026WL/LC/26MX (Vilber Lourmat, Alemania).

5.5.3 Secuenciación

Los productos de PCR amplificados se limpiaron con la enzima ExoSap-IT (Affimetrix, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente la secuencia de bases de ambas hebras se determinó por electroforesis capilar en un secuenciador modelo 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, USA) con los iniciadores externos 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC AG-3'), 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') y los iniciadores internos 514F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3') y 800R (5'-CTACCAGGGTATCTAAT-3'). Se usó el Big Dye Terminator V.3.7 Cycle Sequencing kit standard (Applied Biosystem, USA). La mezcla de secuenciación se preparó a un volumen final de 20 μ L conteniendo 2.5X del Ready Reaction Premix, 5X del Big Dye Sequencing Buffer, 4 pM de cada iniciador y 40 ng del DNA templado. Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 1 min, seguida de 35 ciclos de 10 s para desnaturalización a 96 °C, un alineamiento a 50 °C por 5 s, una extensión a 60 °C por 4 min, y una extensión final a 60 °C por 4 min. Las secuencias correspondientes al 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, la que se comparó con las secuencias depositadas en la base de datos de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mediante la opción BLASTN (Zhang *et al.*, 2000).

5.6 Análisis de datos

El patrón de distribución espacial de las enfermedades, se determinó calculando el índice de Morisita (Badii *et al.*, 2011); el cual emplea la siguiente ecuación $I_b = [S n_i (n_i - 1) / n (n - 1)] / N$, donde I_b es el índice de Morisita, n_i es el número de individuos en "i" ésima unidad muestral, n es el número de individuos en todas unidades

muestrales, y N es el número de unidades muestrales. Valores de h_0 menor, igual o mayor de 1 indican distribuciones de tipo uniforme, aleatoria y agregada, respectivamente. Además, se realizó la prueba de significancia del índice de Morisita por medio de la ecuación $F_c = [h_0 (n-1) + N-n]/(N-1)$.

La distribución espacial observada de la enfermedad en la zona de estudio, se representa en mapa generado en el programa Arc.GIS versión 9.3, a escala 1:500000, para lo cual se emplearon y sobrepusieron capas de los factores de suelo y precipitación de Salgado *et al.* (2009).

Además, se calculó el porcentaje de la incidencia por plantación (sitio de muestreo) tomando en cuenta los casos positivos y negativos, del total de tallos analizadas y el número de tallos que resultó positivas para cada enfermedad. Para ello se utilizó la ecuación: $I = \frac{\sum n}{\sum N} \times 100$; dónde: I , n , N , son el porcentaje de incidencia de la enfermedad, 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 de genes 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 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), fueron alineadas con la secuencia del fragmento amplificado de la cepa aislada. Los alineamientos múltiples de secuencias nucleotídicas se realizaron con el programa CLUSTAL W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). El alineamiento resultante fue empleado para hacer un árbol de similitud con el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) versión 6.05 utilizando el método de agrupamiento de Neighbour-joining con el índice Poisson (P). Se valoraron estadísticamente, para lo cual se hizo 1000 aleatorizaciones tipo “bootstrap”.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Análisis serológico

Las imágenes de las membranas reveladas, previamente impregnadas con extracto de jugo de la zona apical (Figura 10a) y zona basal (Figura 10b) de caña de azúcar y fijadas al calor seco. La coloración azul en determinados puntos indica la presencia de bacteria de acuerdo al testigo positivo, los espacios en blanco indican la ausencia de bacteria de acuerdo al testigo negativo. Así, Los resultados de las pruebas serológicas realizadas en los 105 sitios de muestreo por cada una de los cinco clones, de los cuatro tipos de suelo y de los dos regímenes de lluvia se presentan en el Anexo 1, y registran la presencia de ambas bacterias *X. albilineans* y *L. xyli* subsp. *xyli*, en algunos de los sitios de la zona cañera de la Chontalpa, Tabasco.

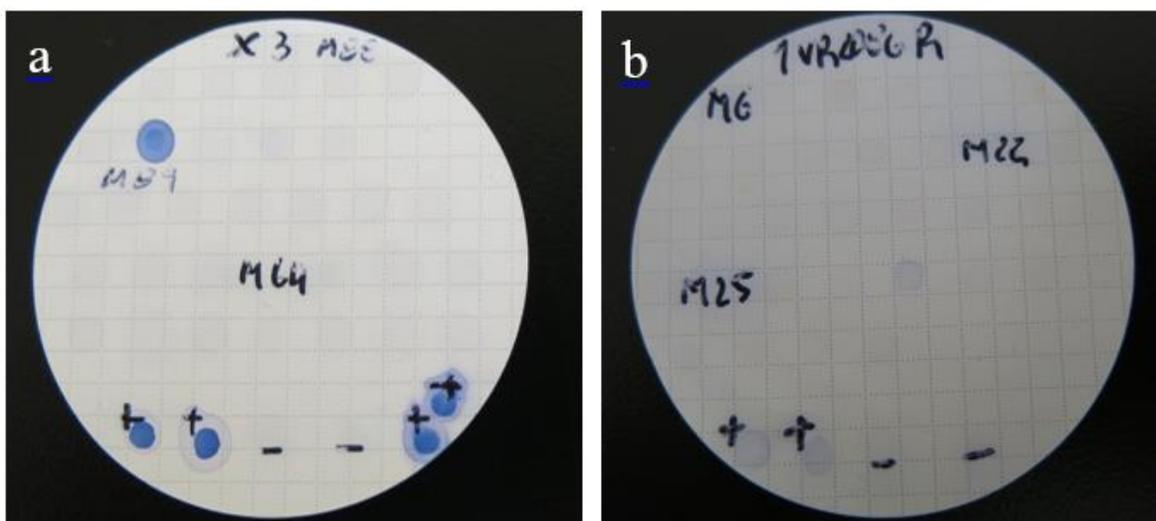


Figura 10. Resultados del análisis serológico de las membranas de nitrocelulosa, se observan los testigos positivos identificados con el signo + y los testigos negativos con el signo -: **a.** membrana con una muestra positiva a escaldadura; **b.** membrana con una muestra positiva a raquitismo de las socas.

Estos resultados se aceptan confiables, a pesar de que se utilizara el anticuerpo de tipo policlónal, que pueden reaccionar con múltiples epítopes sobre la superficie del antígeno. Además, presentan la ventaja de ser más tolerantes a cambios menores en el antígeno, como polimorfismo, heterogeneidad de glicosilación o ligera desnaturalización (Narayanasamy, 2011), Así mismo, se consideró importante tomar en cuenta los señalamientos de Huerta *et al.* (2009) de la existencia en México de cierta variabilidad génica de *X. albilineans* y que al desconocer el biotipo presente en la región, el empleo de un anticuerpo monoclonal podría no reaccionar ante la cepa local, lo que pondría en duda los resultados. Así, que la posibilidad de éxito se ampliaría con el empleo de un anticuerpo policlónal, y la posibilidad de que dicho anticuerpo pudiese reaccionar con otras especies del mismo género; se confirmaría con la identificación molecular de dicho agente causal. Esto considerando que en México, en los estados de Morelos y Veracruz se detectó la enfermedad gomosis de la caña de azúcar, causada por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *Vasculorum*; y aunque esta bacteria no se ha detectado en la zona de estudio en Tabasco, se realizaron aislamientos, a partir de plantas sintomáticas en fase crónica de la escaldadura de la hoja para su identificación molecular, a fin de ratificar los resultados serológicos del estudio.

Por otra parte, en el cultivo de caña de azúcar la bacteria *L. xyli* subsp. *xyli* no presenta variabilidad genética según reporta Young *et al.* (2006), el cual realizó por diferentes técnicas un amplio estudio, utilizando 105 aislamientos de nueve países; y por tratarse de una bacteria Gram positiva, es difícil encontrar que este anticuerpo se acople con alguna otra bacteria presente en el jugo de la caña.

6.2 Presencia de escaldadura (*X. albilineans*) por factor de estudio

6.2.1 Análisis por clon

Los resultados muestran que de las 210 muestras analizadas por clon (10 tallos/21 sitios) los clones CP 72-2086 y RD 75-11 resultaron negativas al antisuero de dicha bacteria. En cambio los clones Mex 69-290, Mex 68-P-23 y Mex 79-431 mostraron resultados positivos. El clon Mex 69-290 mostró reacción positiva en una muestra de uno de los 21 sitios muestreados; el clon Mex 68-P-23 se mostró positivo en tres muestras, de dos de los 21 sitios y el clon Mex 79-431 reveló positiva en una muestra de uno de los 21 sitios cultivados con caña de azúcar. De forma general podemos decir que solo cinco de las 1050 muestras mostraron positivas. En el caso de los clones CP 72-2086 y RD 75-11, los resultados obtenidos eran de esperarse pues ambos clones se comportan de manera resistente a la escaldadura de acuerdo a los ensayos de resistencia varietal realizados por Chávez (2000) y Huerta *et al.* (2003). Los clones Mex 69-290 y Mex 68-P-23 que mostraron repuestas positivas y clasificados por Chávez (2000) como clones tolerantes; en tanto que, el clon Mex 79-431 que dicho autor lo clasificó como moderadamente resistente; sin embargo, Huerta *et al.* (2003) clasificó a estos clones en un grado menor de resistencia. Los clones Mex 69-290 y Mex 68-P-23 las ubicó como susceptible y a la Mex 79-431 como parcialmente resistente. Considerando que en ninguna de las plantaciones, empleadas como sitio de muestreo, se observaron plantas con síntomas de alguna de las formas de expresión de la enfermedad, al momento del muestreo, incluidas aquellas plantas que resultaron positivas a *X. albilineans*. Permite afirmar que los resultados positivos para estos tres clones coinciden con la descripción de la expresión latente de la escaldadura tal como describieron Tokeshi (1980), Ovalle (2012) y Salgado *et al.* (2013), para clones tolerantes. En ese sentido y debido a la forma de expresión de los síntomas de forma latente, el comportamiento de los tres clones que resultaron positivos deben ser considerados tolerantes como indicó Chávez (2000).

6.2.2 Análisis por tipo de suelo y régimen de lluvia

En cuanto a los tipos de suelo bajo estudio (Cambisol, Gleysol, Vertisol y Fluvisol) los resultados muestran que en los suelos Cambisol y Vertisoles una muestra resulto positiva, en los suelos Gleysoles dos muestras resultaron positivas, y en los suelos Fluvisoles no se revelo ninguna muestra positiva.

Referente al régimen de lluvia, los resultados muestran que los sitios que se revelaron positivos, cultivados con tres de los cinco clones que revelaron presencia de la bacteria *X. albilineans*, estaban ubicados en el régimen de precipitación baja (1793-1936 mm).

Aunque esto podría interpretarse erróneamente como la existencia de una correlación entre la presencia de la enfermedad y estos dos factores, debido a que se conoce que la severidad de la escaldadura es favorecida por ciertas condiciones ambientales y el estado fisiológico del cultivo de la caña de azúcar (Rott y Davis, 2000), O como establecen Klett y Rott, (1994) que *X. albilineans* puede encontrarse en la superficie de las hojas con síntomas o en la inflorescencia de la caña, pudiendo diseminarse mediante la acción de la lluvia, el rocío, los insectos, el contacto entre las hojas y el aire. Sin embargo los resultados obtenidos de la presencia focalizada de la enfermedad en las condiciones de menor régimen de lluvia y suelos Cambisol, Gleisol, Vertisol no pueden ser atribuidos en ningún caso a condiciones de estos factores ya que la enfermedad se observa limitada a una proporción baja del área de estudio. Por lo tanto se debe contemplar hacer un muestreo, con un número mayor de puntos de muestreo, así como de un mayor número de muestras en cada punto, para con ello poder obtener conclusiones más acertadas.

6.3 Distribución espacial de sitios positivos a *X. albilineans*

En el plano de la Figura 11, se presentan ubicados las 105 plantaciones muestreadas, diferenciándolas por los resultados de las pruebas serológicas: positivas (punto verde) y negativas (punto negro). Así cuatro plantaciones prospectadas resultaron positivas, lo que indica la presencia de la bacterias *X. albilineans*, en la zona cañera de la Chontalpa, Tabasco. Es relevante observar que tres de los cuatro sitios positivos se ubican en el área sur oeste de la zona de estudio, situados aproximadamente a 2.5 Km de distancia uno de los otros, por lo que se consideran como un foco de la enfermedad. El cuarto sitio de muestreo positivo se ubica a 9 km al Norte del foco antes descrito, en la zona centro del área cañera y se consideró como un sitio de dispersión.

Considerando que el valor de Índice de Morisita calculado ($I_b = 10.5$) es mayor a 1, nos indica que el patrón de la distribución espacial de la enfermedad es en agregado, resultado que es ratificado por la prueba de hipótesis en donde el valor de $F_{calculada}$ (5.41) es mayor al valor de $F_{tabulada}$ (1.6), por lo que se rechazó la H_0 ($H_0: I_b = 1$), es decir el valor de $I_b > 1$ y la dispersión es agregada (Badii *et al.*, 2011). Taylor (1984) menciona que la dispersión agregada es la más comúnmente encontrada en la naturaleza, en este tipo de dispersión existe una atracción entre los individuos, ya que al encontrar un individuo en un punto de muestreo, la probabilidad de encontrar otro individuo en el mismo punto se incrementa.

Considerando que la escaldadura de la hoja en la Chontalpa se está manifestando en su forma latente, y que ésta forma favorece la diseminación de la bacteria. Pone en riesgo la productividad regional. Sin embargo, la detección en solo cuatro plantaciones de las 105 muestreadas, revelan una proporción baja de plantaciones afectadas, por lo que la detección es oportuna y permiten que se pueden tomar acciones de manejo integral de dicha enfermedad tal como señala Ovalle (2012); en los cuales, deben contemplar al menos la utilización de semilla sana de semillero certificado o que provenga de tratamiento hidrotérmico.

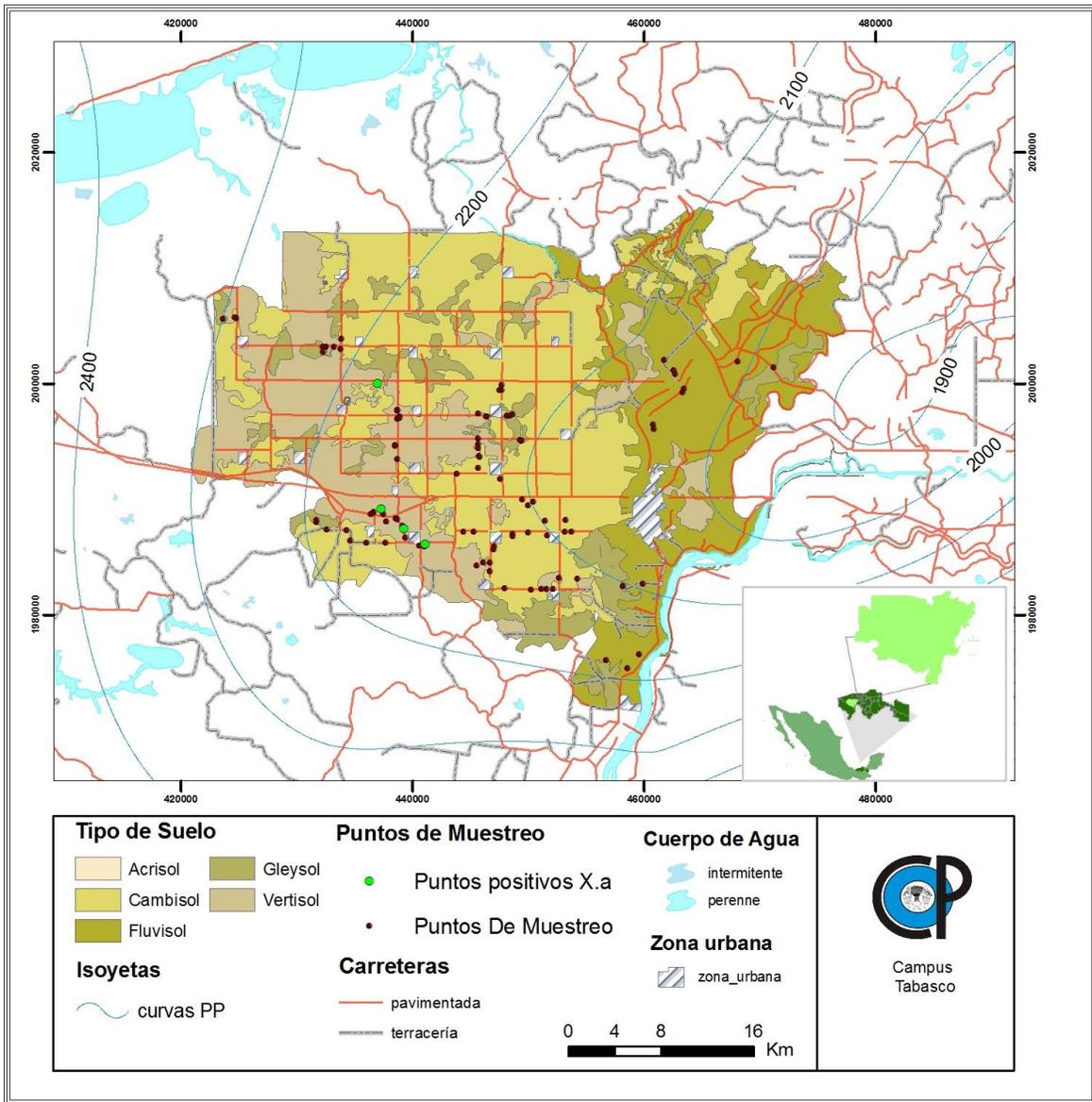


Figura 11. Ubicación de los sitios de muestreos de *X. albilineans* correspondientes a las plantaciones de caña de azúcar por resultado: puntos de muestreo color café, puntos positivos color verde.

6.4 Porcentaje de Incidencia de *X. albilineans*

El Cuadro 2, se muestran el porcentaje de incidencia de *X. albilineans* encontrada en las plantaciones correspondiente a los sitios de muestreo, por clon, tipo de suelo y régimen de lluvia. Se observa que la incidencia detectada en general varía en un rango de 10 a 20 % tomando en cuenta las cuatro plantaciones que resultaron

positivas. Así, las plantaciones de los clones MEX 69-290, MEX 79-431 mostraron incidencias del 10 % en un punto de muestreo; en tanto que las dos plantaciones positivas con el clon MEX 68-P-23 mostraron incidencia, de 10 y 20 % en dos puntos de muestreo.

Cuadro 2. Porcentaje de incidencia de *X. albilineans* en tallos de caña de azúcar de cinco clones cultivadas en cuatro tipos de suelo de dos régimen de lluvia en los 105 sitios muestreados de la zona Chontalpa, Tabasco, México.

Suelo/Clon	Régimen de humedad (1793-1936)					Régimen de humedad (1937-2085)				
	Cambisol	Gleysol	Vertisol	Fluvisol	N/P	Cambisol	Gleysol	Vertisol	Fluvisol	N/P
CP 72-2086	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mex 68-P-23	0	0	0	0	10	0	0	0	0	20
Mex 69-290	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
Mex 79-431	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
RD 75-11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Nota: NP = Suelo no presente en este régimen de humedad.

Tomando en cuenta lo anterior, así como la falta de tratamiento térmico a la semilla y el desconocimiento de la presencia de la enfermedad en la región, pese a que Salgado *et al.* (2009) advirtieran que la composición clonal de la región cañera de la Chontalpa presentaba alta vulnerabilidad a dicha enfermedad, ponen en riesgo la producción regional. Dado que la escaldadura de la hoja reduce el crecimiento y el número de tallos, influyendo negativamente en el desarrollo de los retoños, causando pérdidas que varían entre 15 y 20% (Rott y Davis, 2000). Así mismo, Ricaud y Ryan (1989) mencionan que cuando la escaldadura de la hoja aparece por primera vez en un país, estado o región existe el grave riesgo de diseminación de la enfermedad, que puede ocurrir con forme al tipo de zafra que se practique, el uso de tallos infectados como fuente de semilla, y a través de las herramientas de corte y la maquinaria agrícola infestada con la bacteria. Además de las pérdidas directas, la escaldadura, causa pérdidas indirectas debido a los costos de resiembra de las zonas afectadas, la obtención de material sano pro medio de termoterapia o cultivo

de tejidos, y la selección de clones resistentes (Rott y Davis, 2000). Por ejemplo, la aparición de la escaldadura de la hoja en Louisiana, USA provocó la pérdida de clones prometedores que se encontraban en proceso de selección y ha llevado a modificar las estrategias de mejora varietal (Hoy y Grisham, 1994).

Sin embargo, considerando el reducido número de plantaciones con resultados positivos y la baja incidencia de la enfermedad en estas, así como la ausencia de síntomas en las plantaciones prospectadas, indica que la enfermedad se está expresando en su forma latente como describen Tokeshi (1980) y Rott y Davis (2000). Así mismo, se puede establecer que la llegada de la bacteria a la región Chontalpa es reciente, es decir dos o tres años atrás, por lo que está en etapa de colonización y dispersión local. Por lo tanto, la detección oportuna realizada en este estudio y la proporción baja de plantaciones afectadas ($4/105 = 4\%$) implica prudentemente la toma de acciones de manejo integral de dicha enfermedad tal como señalan Fucikovsky (2002) y Ovalle (2012); que deben contemplar la utilización de semilla sana así como la desinfestación de las herramientas de corte.

6.5 Presencia de raquitismo (*L. xyli* subsp. *xyli*) por factor de estudio

6.5.1 Análisis por clon

Los resultados muestran que de las 210 muestras por clon (10 tallos/21 sitios) que se tomaron, el clon Mex 79-431 resultó negativa a la enfermedad. Por el contrario los clones Mex 69-290, Mex 68-P-23, CP 72-2086 y RD 75-11 mostraron resultados positivos. Los clones Mex 69-290, Mex 68-P-23, CP 72-2086 resultaron positivas en una muestra de uno de los 21 sitios; en tanto el clon RD 75-11 resultó positiva en cuatro muestras de dos de los 21 sitios muestreados, por lo que podemos decir que solo 7 de las 1050 muestras resultaron positivas.

Estos resultados coinciden con lo reportado por Castillo *et al.* (2009), quienes observaron la presencia de la enfermedad en los cinco clones bajo evaluación (Mex 69-290, Mex 68-P-23, Mex 79-431, CP 72-2086 y RD 75-11), de igual manera Comstock (2008) señala que la severidad de la enfermedad está relacionada con el clon, reportando al clon CP 72-2086 como tolerante, ya que la bacteria fue capaz de colonizar el clon pero las pérdidas ocasionadas no fueron significativas. Además si consideramos que Brumbley *et al.* (2006) sugiere que existe una estrecha relación entre patógeno-planta desde los inicios del mejoramiento genético del cultivo, ya que *L. xyli* subsp. *xyli* parece ser patógeno natural de *S. spontaneum*, la cual se hibridó con *S. officinarum* en la década de 1920 para producir el primer clon híbrido moderno, todo esto sugiere que la bacteria y la planta comparten una larga historia de interacción lo que dificulta encontrar clones resistentes a este patógeno.

6.5.2 Análisis por tipo de suelo y régimen de lluvia

En cuanto a los tipos de suelo bajo estudio (Cambisol, Gleysol, Vertisol y Fluvisol) los resultados muestran que se detectó *L. xyli* subsp. *xyli* en plantaciones cultivados en los suelos Vertisoles Cambisol, en dos sitios para cada tipo de suelo, en tanto en los suelos Gleysoles se revelo positivo un sitio, y en los suelos FLuvisoles no se revelo ninguna muestra positiva.

Por otra parte, para el régimen de lluvia, muestran que los sitios que se revelaron positivos a la presencia de la bacteria *L. xyli* subsp. *xyli*, estaban ubicados en los dos régimen de precipitación, dos puntos en el régimen de precipitación bajo (1793-1936 mm) y tres puntos en el régimen de precipitación alto (1937-2085 mm).

China (2000) menciona que la enfermedad se expresa más severamente en condiciones de estrés hídrico y altas temperaturas, debido al carácter sistémico de la misma. Sin embargo como se mencionó con anterioridad los resultados obtenidos de la presencia focalizada de la enfermedad no pueden ser atribuidos en ningún caso a condiciones de estos factores ya que la enfermedad se observa limitada a una proporción baja del área de estudio

6.6 Distribución espacial de sitios positivos a *L. xyli* subsp. *xyli*

En el plano de la Figura 12, se presenta la ubicación de las plantaciones correspondientes a los 105 sitios de muestreo conforme a sus resultados: positivos o negativos a la bacteria *L. xyli* subsp. *xyli*. Así, se aprecia que la bacteria está presente en cinco plantaciones de la región cañera de la Chontalpa. Además se hace notar que como ocurrió con la distribución de *X. albilineans* (Figura 10), también se observa que la distribución de *L. xyli* subsp. *xyli* (Figura 11) en las cinco plantaciones cañeras de la zona Chontalpa; es focalizada. De igual manera el valor del Índice de Morisita calculado ($I_b = 7.5$) es mayor a 1, lo que nos indica que el patrón de distribución espacial de la enfermedad es en agregado, resultado que es ratificado por la prueba de hipótesis en donde el valor de $F_{calculada}$ (7.22) es mayor al valor de $F_{tabulada}$ (1.6), por lo que se rechazó la H_0 ($H_0: I_b = 1$), es decir el valor de $I_b > 1$ y la dispersión es agregada (Badii *et al.*, 2011). Este echo puede deberse a que; al no haber renovado los campos cañeros de esta zona ha ayudado a que esta enfermedad no se haya diseminado en una mayor proporción, considerando que su principal forma de propagación es a través de los tallos infectados usados como semilla, o por las herramientas de corte. Así mismo, la detección en solo cinco plantaciones de las 105 muestreadas muestra una proporción baja de plantaciones afectadas por lo que se pueden tomar acciones de Manejo integral de dicha enfermedad tal como señala (Frison y Putter, 1993). En los cuales deben contemplar al menos la utilización de semilla sana (Plantilla certificada), que provenga de tratamiento hidrotérmico o de cultivo de tejidos.

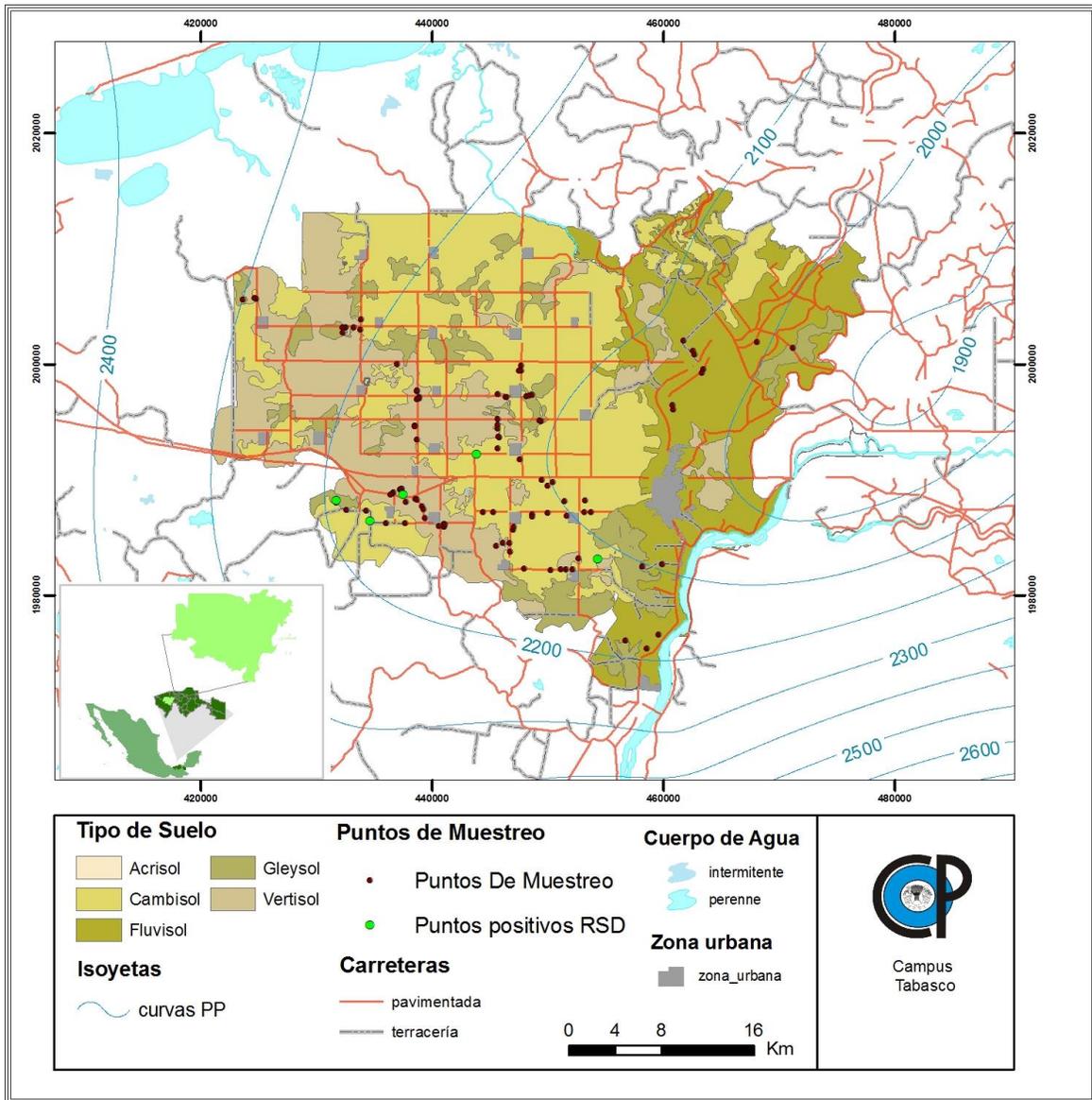


Figura 12. Ubicación de los sitios de muestreos de *L. xyli* subsp. *xyli* correspondientes a las plantaciones de caña de azúcar por resultado: puntos de muestreo color café, puntos positivos color verde.

6.7 Porcentaje de Incidencia de *L. xyli* subsp. *xyli*

El cuadro 3, se muestran el porcentaje de la incidencia de *L. xyli* subsp. *xyli* detectada en las plantaciones de los sitios muestreados, por clon, tipo de suelo y régimen de lluvia. Se observa que la incidencia detectada varía en un rango de 10 a 30% tomando en cuenta las cinco plantaciones que resultaron positivas. Las

plantaciones de los clones CP 72-2086, Mex 69-290 y Mex 68-P-23 mostraron incidencias del 10% para un punto de muestreo respectivamente; en tanto que, las dos plantaciones positivas con el clon RD 75-11, mostraron incidencia, de 10 y 30% en cada punto de muestreo. Así también, se muestra que el clon Mex 79-431 se mostró libre de dicha bacteria.

Cuadro 3. Porcentaje de incidencia de *L. xyli* subsp. *xyli* en tallos de caña de azúcar de cinco clones, cultivados en cuatro tipos de suelo de dos régimen de lluvia en los 105 sitios muestreados de la zona Chontalpa, Tabasco, México.

Suelo/Clon	Régimen de humedad (1793-1936)				Régimen de humedad (1937-2085)																	
	Cambisol	Gleysol	Vertisol	Fluvisol	Cambisol	Gleysol	Vertisol	Fluvisol														
CP 72-2086	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	N/P	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mex 68-P-23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N/P	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mex 69-290	0	10	0	0	0	0	0	0	0	N/P	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mex 79-431	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N/P	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RD 75-11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N/P	0	0	0	0	30	0	0	10	0	0	0	0

Nota: NP = Suelo no presente en este régimen de humedad.

Estos resultados coinciden parcialmente con los de Castillo *et al.* (2009) quienes calificaron mediante la técnica de tención de vasos por transpiración a los clones Mex 69-290 y Mex 68-P-23 como susceptibles al raquitismo de las socas. Sin embargo, deja entrever a los clones Mex 79-431 y CP 72-20-86 como resistente. De igual manera Comstock, (2008) califica al clon CP 72-2086 como resistente. Aunque ambos señalan la presencia de la bacteria, sin tener un efecto sobre los rendimientos.

Aunque para el clon RD75-11 no tenemos un reporte sobre su comportamiento respecto al raquitismo podemos decir que dado el hecho de detectar dos sitios positivos y uno con una incidencia máxima del 30%; este clon debe tener un nivel de susceptibilidad igual o mayor a las dos primeras Mex 69-290 y Mex 68-P-23.

Así, podemos decir que el rendimiento de caña de azúcar en algunas plantaciones de la zona cañera de la Chontalpa, puede estar afectado por esta enfermedad.

Comstock (2002), menciona que las pérdidas en rendimiento debidas al raquitismo de la socas varían, dependiendo del clon, de las condiciones climatológicas y del grado de infección. Aunque hay que mencionar que las pérdidas de producción son más altos en condiciones las sequías o condiciones de estrés, pero en general las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad van desde o has el 30% (Comstock, 2008; Davis *et al.*, 1984; Ovalle *et al.*, 2008)

Esto demuestra que existe variabilidad en la tolerancia a la infección por la bacteria causante del raquitismo de las socas y que las pérdidas son diferentes dependiendo del clon. Por lo tanto se debe de contemplar en la zona de la Chontalpa, el uso de clones tolerantes con buena adaptabilidad a las condiciones climáticas imperantes en la región así como el uso de material de siembra sano que puede ser obtenido por termoterapia o por medio de cultivo de tejidos.

6.8 Identificación de *X. albilineans*

6.8.1 Aislamiento de *X. albilineans*

En la Figura 13a se muestra una hoja de cañas en desarrollo, con líneas de lápiz, síntoma típico de la fase crónica a partir de la cual se realizó el aislamiento de la bacteria causante de la enfermedad de la escaldadura de la hoja. En la Figura 13b se muestra el cultivo de *X. albilineans*, en cajas Petri con medio Agar Nutritivo. Todas las colonias bacterianas fueron de 1 mm de diámetro, que se consideran pequeñas. Las colonias fueron visibles después de los siete días de incubación, lo que corrobora lo reportado por Huerta *et al.* (2003). Estas colonias eran circulares, de bordes lisos, de color claro y no mucoides, circulares, uniformes (Figura 13c); tal como las describieron (Alvez *et al.*, 2011).

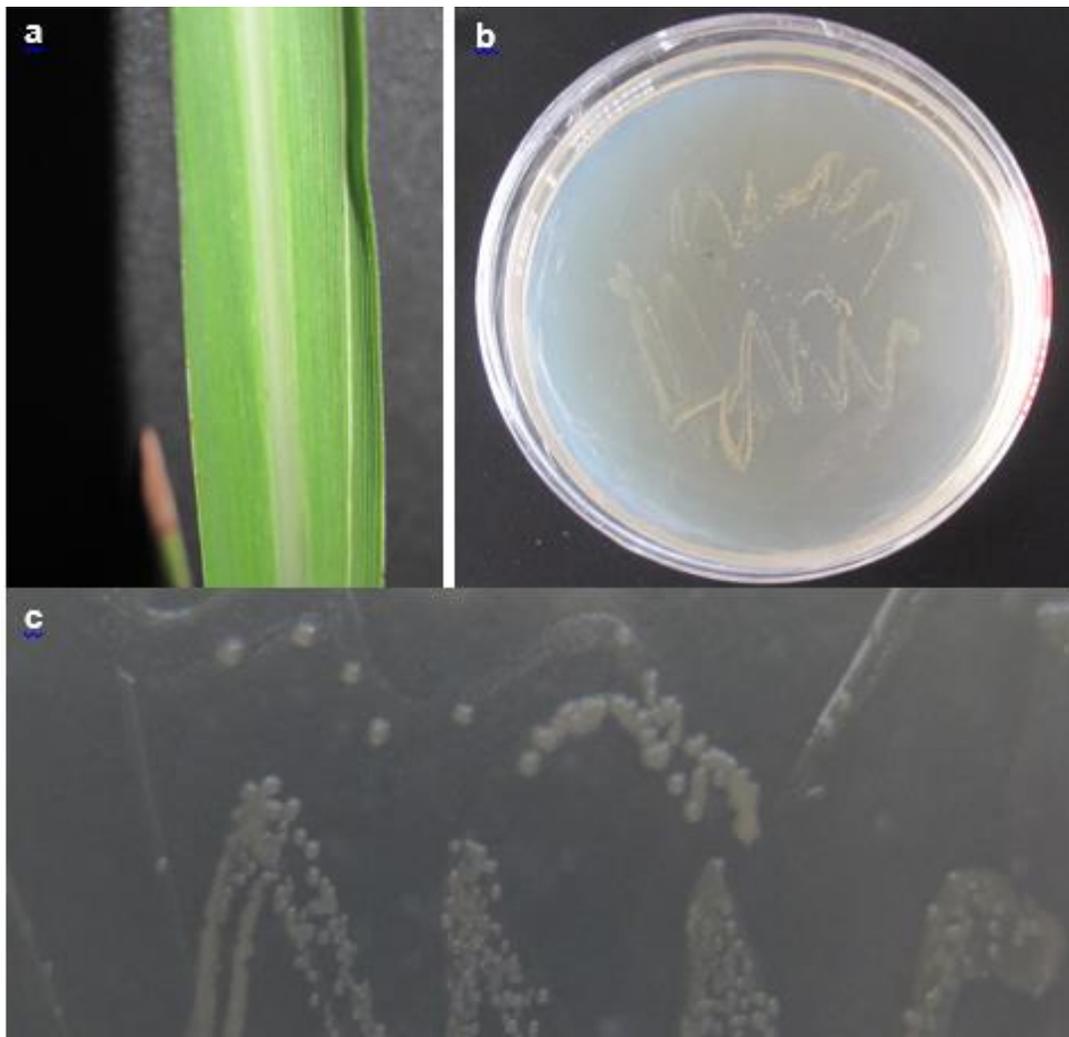


Figura 13. Detalles del aislamiento de *X. albilineans*: **a.** Hoja de caña de azúcar con síntoma de línea de lápiz empleada en el aislamiento de la bacteria *X. albilineans*; **b.** colonias bacterianas típicas de dicha bacteria en agar nutritivo; **c.** Acercamiento fotográfico de las colonias típicas de *X. albilineans*.

6.8.2 Identificación molecular de *X. albilineans*

Extracción del DNA: El protocolo propuesto por Doyle y Doyle (1990). Resulto apropiado para la extracción del DNA de las colonias bacterianas. La cuantificación de la calidad del DNA se realizó mediante espectrofotómetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific, USA). Se prepararon diluciones a una concentración de 20 ng μL^{-1} . Las cuales fueron empleadas para la PCR.

Amplificación: Los iniciadores 8F y 1492R, permitieron la identificación de *X. albilineans* al amplificar una banda de 1392 bp, Para verificar los productos de PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Figura 14) muestra que hubo amplificación de la región 16S rDNA

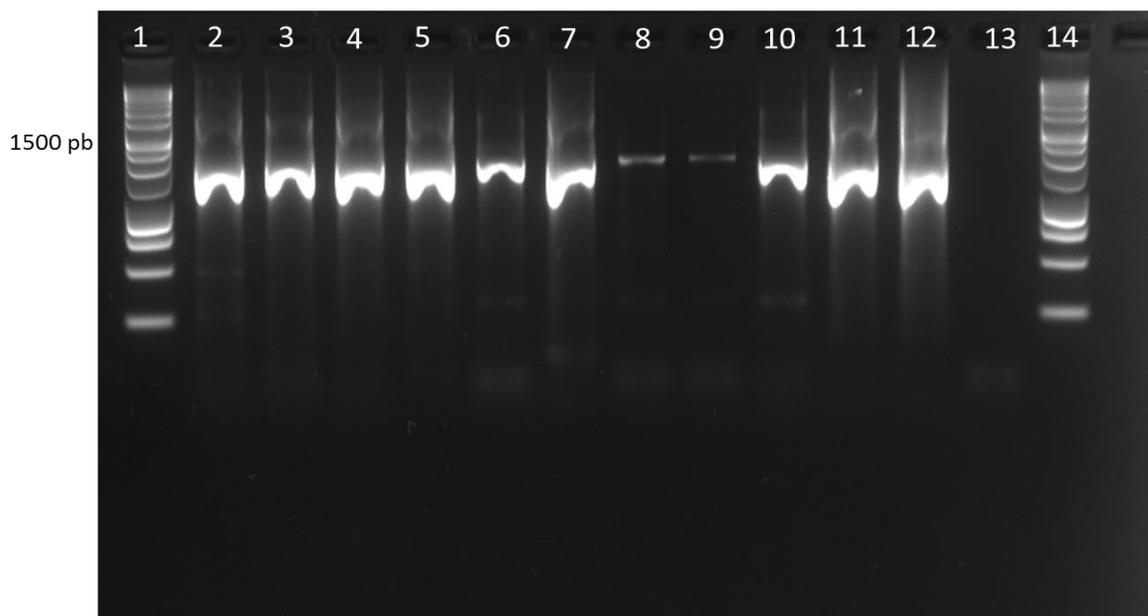


Figura 14. Amplificación por PCR. Línea 1, 14: marcador de peso molecular (1kb); 13: control negativo; 2-11: células de *X. albilineans*.

Secuenciación: Los productos de PCR amplificados fueron secuenciados por electroforesis capilar, con los iniciadores externos 8F/1492R y los iniciadores internos 514F/800R. La secuencia obtenida correspondiente al 16S rDNA fue ensamblada para crear una secuencia consenso la cual se comparó con las secuencias depositadas en la base de datos de GenBank mediante la opción BLASTN (Zhang *et al.*, 2000).

La secuencia obtenida (Figura 15) tiene máxima identidad (100 por ciento) con la accesión número NR_074403 depositada el 30 de enero de 2013 en el GenBank. De igual manera fue alineada con las secuencia nucleotídicas codificantes de genes 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 de la

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Los alineamientos múltiples de secuencias nucleotídicas se realizaron con el programa CLUSTAL W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) disponible en línea.

```
1      TGCAAGTCGAACGGCAGCACAGTGGTAGCAATACCATGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATA
68     CATCGGAATCTACCTTTTCGTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATAACGACCTTA
135    GGGTGAAAGCGGAGGACCTTCGGGCTTCGCGCGGATAGATGAGCCGATGTCCGATTAGCTAGTTGGC
202    GGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACT
269    GAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGAT
336    CCAGCCATGCCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGGAAGAAAAGCA
403    GTCGGTTAATACCCGATTGTTCTGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAG
470    CCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGTGGTTG
537    TTTAAGTCCGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAATTGCAGTGGATACTGGGCAACTAGAGTG
604    TGGTAGAGGATGGCGGAATTCGCCGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACATCTGTGG
671    CGAAGGCGGCCATCTGGACCAACACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA
738    TACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAACTTGGCACGCAGTATCG
805    AAGCTAACCGGTTAAGTTCGCCGCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACG
872    GGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTT
939    GACATCCACGGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGC
1006   TGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTT
1073   GCCAGCACGTAATGGTGGGAACCTAAGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGAC
1140   GTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTACTACAATGGTAAGGACAGAGGGCTGC
1207   AAACGCGAGAGTGAGCCAATCCAGAAACCTTATCTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACT
1274   CCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
1341   TACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTTGTTCACCAGAAGCAGGTAGCT
```

Figura 15. Secuencia nucleotídica de *X. albilineans* obtenida del aislamiento de la bacteria en plantas sintomáticas en plantaciones cañeras de la zona Chontalpa, del estado de Tabasco, México.

El alineamiento resultante fue empleado para hacer un árbol de similitud con el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) versión 6.05, utilizando el método de agrupamiento de Neighbour-joining con el índice Poisson (P). Se valoraron estadísticamente, para lo cual se hizo 1000 aleatorizaciones tipo “bootstrap” (Figura 16).

Así, el aislamiento de *X. albilineans* obtenido de la región Chontalpa, presentó un 100 por ciento de similitud con las secuencias depositadas en el Gen Bank. Este resultado confirma la presencia *X. albilineans* en la zona cañera de la Chontalpa, Tabasco. Esto permite aceptar la hipótesis, que señalaba la presencia de este patógeno, causante de la escaldadura de la hoja, además permite realizar el primer reporte de la presencia de *X. albilineans* en Tabasco.

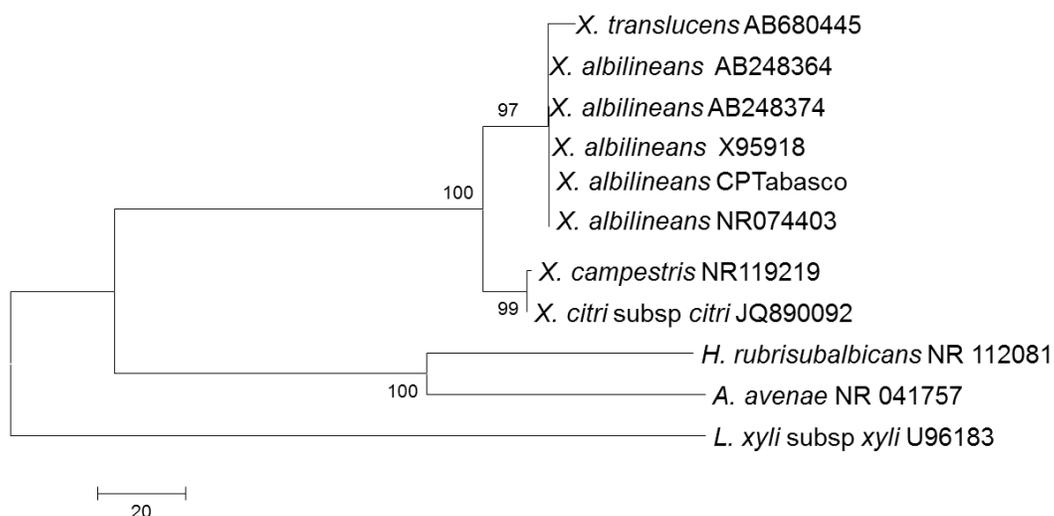


Figura 16. Árbol filogenético, construido con el método de Máxima parsimonia con 1000 repeticiones bootstrap usando el programa MEGA 6.05. En el árbol filogenético se contrasta la secuencia obtenida del aislamiento de Tabasco, contra la cepa de referencia, otras especies de *Xanthomonas* y otros patógenos bacterianos que afectan el cultivo de la caña de azúcar.

7 CONCLUSIONES

Se confirmó la presencia de las bacterias *Xanthomonas albilineans* y *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causante de la escaldadura de la hoja y el raquitismo de las socas, respectivamente, en la región cañera de la Chontalpa, Tabasco.

La bacteria *X. albilineans* causante de la escaldadura de la hoja se manifiesta en forma latente, en tres de los clones evaluados formando un pequeño foco y un punto de dispersión.

La bacteria *L. xyli* subsp. *xyli* causante del raquitismo de las socas tiene algunos focos de dispersión, que se encuentran localizados en la parte sur de la región cañera de la Chontalpa.

Los niveles de incidencia de *X. albilineans* se encuentra entre el 0 a 20%, habiéndose detectado la enfermedad solamente en cuatro plantaciones; en tanto para *L. xyli* subsp. *xyli* los niveles de incidencia están entre 0 y 30%, detectando la enfermedad en cinco plantaciones de la región de la Chontalpa.

La bacteria *X. albilineans*, se detectó en tres clones Mex 69-290, Mex 68-P-23 y Mex 79-431; en tanto la bacteria *L. xyli* subsp. *xyli*, se detectó en los clones CP 72-2086, Mex 68-P-23, Mex 69-290 y RD 75-11.

8 RECOMENDACIONES

Considerando los medios de diseminación de ambas enfermedades, se recomienda la implementación de un programa de manejo integral, basados en la selección de clones resistentes, así como la certificación de semilleros libres de estos patógenos mediante el uso del tratamiento térmico de la semilla con agua caliente o por medio de cultivo de tejidos y la desinfección química de la herramienta empleada en el corte de la semilla con algún agente bactericida.

El uso de la técnica serológica “*Dot blot immunoassay*” permite diagnosticar y cuantificar la presencia de la bacteria en los tallos, aun si estas no presentan síntomas visibles, por lo que se puede adoptar como una herramienta confiable para certificar la calidad de semilleros a utilizar en el establecimiento o renovación de las plantaciones cañeras.

9 LITERATURA CITADA

- Agrios G., N. 2005. Plant pathology. 5th ed. Nueva York: Elsevier Academic Press. 903 p.
- Alvez B., J. Carballo, G. Alonso, 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(1): 27-36.
- Anne L., A. P. Martinelli., M. C. Dornelas. 2014. Anatomy and Morphology. In: Sugarcane: physiology, biochemistry, and functional biology. P. H. Moore., C. B. Frederyk. (eds). Word and agriculture series pp: 19-34.
- Amaya E., A. 1986. Morfología de la caña de azúcar. En: El Cultivo de la caña de azúcar. Técnicaña. Memorias. C. E., Buenaventura O. (ed). Cali Colombia. pp: 13-26.
- Badii M. H., A. Guillen, E. Cerna, J. Landeros 2011. Dispersión Espacial: El Prerrequisito Esencial para el Muestreo. *International Journal of Good Conscience*. 6(1):40-71.
- Batista L., I. Peña., D. López., J. Pérez., y R. Llauger. 2008. Técnicas de diagnóstico de enfermedades que afectan a los cítricos. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. La Habana, Cuba. 12 p.
- Botha F. 2009. Energy Yield and Cost in a Sugarcane Biomass System. En: *Proc. Aust. Soc. Sugar Cane Technol.* 31: 1–10.
- Brumbley S. M., L. A. Petrasovits, S. R. Hermann, A. J. Young, y B. J. Croft. 2006. Recent advances in the molecular biology of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*: causal organism of ratoon stunting disease. *Australasian Plant Pathology* 35(6): 681-689.

- Casagrande M. V., A. Sanguido, E. Ferezini. 1997. Evolução, prejuízos e métodos de controle de quatro importantes doenças da cana de açúcar. In: VII Seminario de tecnología agronómica. Centro de tecnología COPERSUCAR. Piracicaba, Brasil. pp: 183-190.
- Castillo M. A., D. A. Rodríguez L., A. Herrera S., V. Enríquez R., R. Mayo L. 2009. Diagnóstico del raquitismo de los retoños de la caña de azúcar en los ingenios el Potrero y La Margarita. Avances en la investigación agrícola, pecuaria, forestal y acuícola en el trópico mexicano. Universidad Veracruzana. pp: 167-172.
- Ceballos L. 2004. Determinación de la concentración adecuada de inóculo de *Xanthomonas albilineans* para la evaluación de resistencia a la enfermedad escaldadura foliar en caña de azúcar (*Saccharum sp*). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. 71 p.
- Chávez, M. R. 2000. Resistencia Varietal a la enfermedad de escaldadura de la caña de azúcar (*Xanthomonas albilineans*). En: 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., S. Flores C. (comps). Programa Nacional de Variedades del FOCYTCAÑA, México D. F. 84 p.
- Chinea, A., H. Nass, C. Daboin, M. D. Díez. 2000. Enfermedades y daños de la caña de azúcar en Latinoamérica. FonAIAP, INICA, FUNDAZUCAR, Universidad de los Andes. Barquisimeto, Venezuela. 108 p.
- Chinea, A., E. Rodríguez. 1994. Enfermedades de la caña de azúcar. Instituto Nacional de Investigación de la Caña de Azúcar INICA, La Habana, Cuba. 99 p.

- Cochereau P., and A. Jean-Bart. 1989. Etat phytosanitaire des cultures de canne à sucre à Marie-Galante, Guadeloupe, Francia. Bulletin Agronomique des Antilles et de la Guyane. pp: 13-19.
- Comstock, J. C. 2008. Sugarcane yield loss due to ratoon stunt. Journal Association Sugar Cane Technologists: 28: 22-31.
- Comstock, J. C. 2002. Ratoon stunting disease. Sugar Technology. 4(2): 1–6.
- Comstock, J. C., M. S. Irey. 1992. Detection of the leaf scald pathogen (*Xanthomonas albilineans*) using tissue blot immunoassay, ELISA, and isolation techniques. Plant Disease 76: 103–105.
- D'Hont A., G. Mendez., M. Menossi., M. Van-Sluys., J. Glaszmann., and E. Ulian. 2008. Sugarcane: A Major Source of Sweetness, Alcohol. and Bio-energy. Springer. 2008. Genomics of tropical crop plants. Springer. pp: 483-513.
- D'Hont A., D. Ison, K. Alix, C. Roux, J. C. Glaszmann. 1998. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. Genome. 41: 221-225.
- Davis, M. J. 1980. Ratoon stunting disease of sugarcane: Isolation of the causal bacterium. Science 210: 1365-1367.
- Davis, M.J and R. A. Bailey. 2000. Ratoon stunting. In: A guide to sugarcane diseases. P. Rott, R. A., Bailey, J. C. Comstock, B. J., Croft, A.S. Saumtally. (eds). Charter: Diseases caused by bacteria. pp: 49-54.
- Davis, M. J., A. G. Gillaspie, Jr., A. K. Vidaver, and R. W. Harris. 1984. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*, pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and Bermuda grass stunting disease. Int. Journal Systematic Bacteriology 34: 107-117.

- Deán, J. L. 1974. A method for isolating *Xanthomonas albilineans* from sugarcane leaves. *Plant Disease*. 58:439-441.
- Domrachev M., S. Federhen, C. Hotton, D. Leipe, V. Soussov, R. Sternberg, S. Turner. 2003. Entrez *Taxonomy*: [Online Data base] www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/ The NCBI Taxonomy Browser Homepage, National Center for Biotechnology Information.
- Doyle J. J., and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12: 13-15.
- Evtushenko L. I., L. V. Dorofeeva, S. A. Subbotin, J. R. Cole, J. M. Tiedje. 2000. *Leifsonia poae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of '*Corynebacterium aquaticum*' Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (ex Leifson 1962) gen. nov., nom. rev., comb. nov. and *Clavibacter xyli* Davis *et al.* 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis *et al.* 1984) gen. nov., comb. Nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 371-380.
- Frison, E. A., A. J. Putter C. 1993. FAO/IBPGR Technical guidelines for the safe movement of sugarcane germplasm. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome/International Board for Plant Genetic Resources, Rome. 44 p.
- Flores C., S. 1997. Las Enfermedades de la Caña de Azúcar en México. Núñez (Ed). Córdoba, Veracruz, México. 285 p.
- Fucikovsky L. 2002. Sugarcane (*Saccharum officinarum* L., *S. barberi* Jeswiet, *S. sinense* Roxb and *S. edule* Hassk). In: Disease of some tropical and subtropical plants caused by bacteria, phytoplasmas and spiroplasmas. pp: 49-63.

- Gao S. J., Y. B. Pan, R. K. Chen, P. H. Chen, H. Zhang, and L. P. Xu. 2008 Quick detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* by PCR and nucleotide sequence analysis of PCR amplicons from Chinese *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* isolates. Sugar Tech 10: 334-340.
- Genoscope. 2008. The tropical bacterium wich threatens sugar cane crops. French National Sequencing Center. French Atomic Energy Commission. En línea: <http://www.cns.fr/spip/Xanthomonas-albilineans-threatens.html>.
- Gillaspie A. G., and D. S. Teakle. 1989. Ratoon stunting disease. In: Diseases of Sugarcane; Major Diseases. C. Ricaud, B. T. Egan, A. G. Gillaspie, Jr., and C. G. Hughes. (eds). Elsevier Science Publishing, Inc., New York. pp: 59-80.
- Grisham, M. P., Y. B. Pan y E. P. Richard Jr. 2007. Early Detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in Sugarcane Leaves by Real Time Polymerase Chain Reaction. Plant Disease 91: 430-434.
- 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.
- Honeycutt R. J., W. S. Sobral B., and M. McClelland. 1995. tRNA intergenic spacers reveal polymorphisms diagnostic for *Xanthomonas albilineans*. Microbiology. 141: 3229-3239.
- Hoy, J. W., M. P. Grisham. 1994. Sugarcane leaf scald distribution, symptomatology, and effect on yield in Louisiana, Plant Disease 78: 1083-1087.
- Hoy, J. W., J. L. Flynn. 2001. Control of ratoon stunting disease of sugarcane in Louisiana with seedcane produced through micropropagation and resistant cultivars. Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol. 24: 417-421.

- Hoy, J. W., M. P. Grisham, and K. E. Damann. 1999. Spread and increase of ratoon stunting disease of sugarcane and comparison of disease detection methods. *Plant Disease*. 83: 1170-1175.
- Huerta L., M., R. I., Rojas M., J. B., Calles. D. Reyes L., M. Becerril H., O. Romero A., O. Franco M., D. Jimenez G., A. Aragon G., A. Simon B., D. Guillen S. 2009. Genetic and pathogenic diversity of *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, in México. *Research Journal of Biological Sciences*. 4(3): 312-319.
- Huerta L., M. A., L. D. Ortega, S. C. Landeros, Z. L. Fucikovsky, 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(5): 511-519.
- INFOCAÑA, Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar. Apartado Infocaña. 2014. Lista de boletines. Disponible en línea en: http://www.infocana.gob.mx/lista_boletines.php?t=1
- ISO, International Sugar Organization. 2009. Sugar Year Book 2009. Documento en línea:
<http://www.isosugar.org/PDF%20files/SUGAR%20YEAR%20BOOK%20-%20sample.pdf>
- Klett P., P. Rott. 1994. Inoculum sources for the spread of leaf scald disease of sugarcane caused by *Xanthomonas albilineans* in Guadeloupe, Francia. *Journal of Phytopathology* 142: 283-291.
- Locci R. 1994. Actinomycetes as plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, Kluwer academic publisher. Netherlands. 100: 179-200.
- Lopes S. A., K. E. Damann, J. W. Hoy, M. P. Grisham. 2001. Infectivity titration for assessing resistance to leaf scald among sugarcane cultivars. *Plant Disease*. 85: 592-596.

- Luz W.C. 2000. Classificação dos seres vivos para o novo milênio. Parte I – o sistema de 25 Reinos em três Domínios. RAPP. 8: 1-25.
- Madigan M. T., J. M. Martinko, J. Parker. 2000. Brock biology of microorganism, 9^a ed. Prentice-Hall, Inc. NY. USA.
- Martín J. P., and P. E. Robinson. 1961. Leaf scald. In: Sugar Disease of the World, Vol 1. J. P. Martin, E. V. Abbott, C. G. Hughes (eds). Elsevier Publishing Co. Amsterdam. pp: 79-107.
- Moore P. H., A. H. Paterson., T. Tew. 2014. Sugarcane: The Crop, the Plant, and domestication. In: Sugarcane: Physiology, Biochemistry, and Functional Biology. P. H. Moore, C. B. Frederyk (eds). Word and agriculture series pp: 1-17.
- Narayanasamy P. 2011. Detection of Bacterial and Phytoplasmal Pathogens. In: Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis. Bacterial and Phytoplasmal Pathogens, Volume 2. Department of Plant Pathology Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, India. 256 p.
- Ordosgoitti F., A. Manzano, A. Piñero. 1977. La escaldadura de la caña de azúcar en Venezuela. Agronomía Tropical 27(2): 235-249.
- Ovalle W. 2012. Enfermedades de la caña de azúcar. En: El Cultivo de la Caña de Azúcar en Guatemala. M. Melgar, A. Meneses, H. Orozco, O. Pérez, R. Espinosa. (eds). Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar. Guatemala. pp: 233-258.
- Ovalle W., S. García. 2008. Efecto de la enfermedad del Raquitismo de las socas (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) en el rendimiento de caña de nueve variedades en cinco cortes. 2004-2008. En: Memoria. Presentación de resultados de investigación. Zafra 2007-2008. CENGICANÑA, Guatemala. pp: 89-93.

- Pan Y., M. P. Grisham, D. Burner. 1998. A polymerase chain reaction protocol for detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal bacterium of sugarcane ratoon stunting disease. *Plant Disease*. 82: 285-290.
- Pan Y. B., M. P. Grisham, D. M. Burner. 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 Disease*. 83: 218-222.
- Parra V., A. I. 1993. Un nuevo problema fitosanitario en la industria azucarera de México. *In: Memoria del Simposio Nacional Sobre la Capacitación y Desarrollo Tecnológico en el Campo Cañero Mexicano. Tomo I. Xalapa, Veracruz, México. pp: 53-61.*
- Pieretti I., M. Royer, V. Barbe, S. Carrere, R. Koebnik, S. Cociancich, A. Couloux, A. Darrasse, J. Gouzy, M. Jacques, E. Lauber, C. Manceau, S. Mengerot, S. Poussier, B. Segurens, B. Szurek, V. Verdier, M. Arlat, P. Rott. 2009. The complete genome sequence of *Xanthomonas albilineans* provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited Xanthomonadaceae. *BMC Genomic*. 10: 616.
- Prossen D., E. Hatziloukas, N. J. Panopoulos, N. W. Schaad. 1991. Direct detection of the halo blight pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seeds by DNA amplification. *Phytopathology* 81: 1159.
- Rao I., G. Singh. 2000. Serological Diagnosis of Ratoon Stunting Disease of Sugarcane in India. *Sugar tech*. 2(4): 35-36.

- Ricaud C., C. Ryan. 1989. Leaf scald. In: Diseases of sugarcane. Major diseases. C. Ricaud, B. T. Egan, Gillaspie Jr. and C. G. Hughes (eds). Amsterdam. The Netherlands: Elsevier Science Publishers. pp: 39-58.
- Rivera N. D. 1985. Epidemiología y pérdidas de *Xanthomonas albilineans*, *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum* y estudio de la marchitez causada por *Fusarium moniliforme* y *Cephalosporium sacchari* en caña de azúcar. Informe Problema ramal. INISAV, MINAGRI. pp: 5-173.
- Romero E. R., P. A. Digonzelli, J. Scandaliaris. 2009. Manual del cañero. Las Talitas Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres, Argentina. 247p.
- Rott P. 1995. Leaf scald of sugarcane. Agriculture and development; CIRAD. pp: 49-56.
- Rott P., M. J. Davis. 2000. Leaf scald. In A guide to sugarcane diseases. P. Rott, R. A., Bailey, J. C. Comstock, B. J., Croft, A.S. Saumtally. (eds). Charter: Diseases caused by bacteria. pp: 49-54.
- Salgado G., S., L. C., Lagunes E., R. Nuñez E., C. F., Ortiz G., L. Bucio A., E. M., Aranda I. 2013. Caña de Azúcar "Producción Sustentable". Colegio de Postgraduados. México 524p.
- Salgado S., D. Palma, J. Zavala, L. Lagunés, M. Castelán, C. Ortiz, J. Juárez, L. Armida, J. Rincon. 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.
- Salgado G., S., D. J., Palma L., L. C., Lagunes E., C. F., Ortiz G., J. M., Ascencio R. 2004. Sistema integrado para recomendar dosis de fertilizantes en caña de azúcar (SIRDF): Ingenio Santa Rosalía. Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. H. Cárdenas, Tabasco, México. 66 p.

- Shen W. K., G. H., Zhou, H. H., Deng, L. Y. Zhou. 2006. Detection of sugarcane ratoon stunting disease pathogen with polymerase chain reaction (PCR) and nucleotide sequence analysis. Chinese Agricultural Science Bulletin. 22(1): 413-416.
- Silva A. M., C. M. Dos Santos, T. M. Arantes, R. P. Pincel. 2010. Fenologia da cana de açúcar. En: Tópicos em ecofisiologia da cana de açúcar. C. A., Crusciol C., A. M. Silva, R. Rossetto, R. Soratto P. (eds). Fundação de estudos e pesquisas agrícolas e florestais. pp: 8-20.
- Silva R., H. V. 2013. Enfermedades Bacterianas Asociadas a Caña de Azúcar. Revista Mexicana de Fitopatología. 31: 63-64.
- Taylor L. R. 1984. Assessing and interpreting the spatial distributions of insect populations. Annual Review Entomology. 29:321-257.
- Tokeshi H. 1980. Enfermedades de la caña de azúcar. En: Manual de Patología Vegetal; enfermedades de las plantas cultivadas. F. Galli, P. Carvalho, H. Tokeshi, E. Balmer, H. Kimati, C. Cardoso, C. Salgado, T. Krugner, T. L. Cardoso, E. J. Bergamin filho (eds). São Paulo: Agronómica Ceres (Ed). 2(12): 141-206.
- Tokeshi H. 1997. Doença da cana de açúcar. ESALQ./USP. Agronómica CERES (Ed). pp: 10-13.
- Victoria J. I., C. Viveros, C. Cassalet, y H. Calderón. 1997. Establecimiento de semilleros limpios, serie técnica No. 22. Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia (CENICAÑA). Cali, Colombia. 19 p.
- Wang Z. K., J. C. Comstock, E. Hatziloukas, N. W. Schaad. 1999. Comparison of PCR, Bio-PCR, DIA, ELISA and isolation on semi-selective medium for the detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald of sugarcane. Plant Pathology 48: 245–252.

- Young A. J., L. A. Petrasovits, B. J. Croft, M. Gillings, S. M. Brumbley. 2006. Genetic uniformity of international isolates of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane (*Saccharum* interspecific hybrids). *Australasian Plant Pathology*. 35: 503–511.
- Zhang Z., S. Schwartz, L. Wagner, and W. Miller. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*. 7: 203-214.

10 ANEXOS

Anexo 1. Puntos de muestreo por clon, tipo de suelo y régimen de humedad de las 105 plantaciones muestreadas.

No.	Clon	Tipo de suelo	Régimen de humedad	Coordenadas (15Q UTM)		Respuesta serológica		Porcentaje de Incidencia	
				X	Y	X.a	Lxx	X.a.	Lxx
1	CP 72-2086	CM	1	444346	1987188	-	-	0	0
2	CP 72-2086	CM	1	447017	1985916	-	-	0	0
3	CP 72-2086	CM	1	450395	1989797	-	-	0	0
4	Mex 68-P-23	CM	1	446686	1983740	-	-	0	0
5	Mex 68-P-23	CM	1	447899	1982297	-	-	0	0
6	Mex 68-P-23	CM	1	450182	1982170	-	-	0	0
7	Mex 69-290	CM	1	449939	1989466	-	-	0	0
8	Mex 69-290	CM	1	443799	1992195	-	+	0	10
9	Mex 69-290	CM	1	445659	1994733	-	-	0	0
10	Mex 79-431	CM	1	445265	1987192	-	-	0	0
11	Mex 79-431	CM	1	446949	1985671	-	-	0	0
12	Mex 79-431	CM	1	453110	1987177	-	-	0	0
13	RD 75-11	CM	1	453185	1988220	-	-	0	0
14	RD 75-11	CM	1	453691	1987178	-	-	0	0
15	RD 75-11	CM	1	446662	1984530	-	-	0	0
16	CP 72-2086	GL	1	447494	1999416	-	-	0	0
17	CP 72-2086	GL	1	447655	1999918	-	-	0	0
18	CP 72-2086	GL	1	447540	1991728	-	-	0	0
19	Mex 68-P-23	GL	1	448125	1997214	-	-	0	0
20	Mex 68-P-23	GL	1	446361	1997184	-	-	0	0
21	Mex 68-P-23	GL	1	449289	1995141	-	-	0	0
22	Mex 69-290	GL	1	445735	1993689	-	-	0	0
23	Mex 69-290	GL	1	448396	1997251	-	-	0	0
24	Mex 69-290	GL	1	449359	1995069	-	-	0	0
25	Mex 79-431	GL	1	445711	1993713	-	-	0	0
26	Mex 79-431	GL	1	445652	1997421	-	-	0	0
27	Mex 79-431	GL	1	446403	1997157	-	-	0	0
28	RD 75-11	GL	1	451404	1988136	-	-	0	0
29	RD 75-11	GL	1	446093	1984525	-	-	0	0
30	RD 75-11	GL	1	447667	1999440	-	-	0	0

Continúa en siguiente página

No.	Clon	Tipo de suelo	Régimen de humedad	Coordenadas (15Q UTM)		Respuesta serológica		Porcentaje de Incidencia	
				X	Y	X.a	Lxx	X.a.	Lxx
31	CP 72-2086	VR	1	448639	1986819	-	-	0	0
32	CP 72-2086	VR	1	452120	1982189	-	-	0	0
33	CP 72-2086	VR	1	454326	1982333	-	+	0	10
34	Mex 68-P-23	VR	1	451603	1986885	-	-	0	0
35	Mex 68-P-23	VR	1	445638	1992693	-	-	0	0
36	Mex 68-P-23	VR	1	445664	1994395	-	-	0	0
37	Mex 69-290	VR	1	449970	1987091	-	-	0	0
38	Mex 69-290	VR	1	454789	1982884	-	-	0	0
39	Mex 69-290	VR	1	449673	1997153	-	-	0	0
40	Mex 79-431	VR	1	449421	1989974	-	-	0	0
41	Mex 79-431	VR	1	445494	1984260	-	-	0	0
42	Mex 79-431	VR	1	452610	1983169	-	-	0	0
43	RD 75-11	VR	1	448639	1986974	-	-	0	0
44	RD 75-11	VR	1	454790	1983012	-	-	0	0
45	RD 75-11	VR	1	445667	1995218	-	-	0	0
46	CP 72-2086	CM	2	439372	1986675	-	-	0	0
47	CP 72-2086	CM	2	434239	1987326	-	-	0	0
48	CP 72-2086	CM	2	433773	2002977	-	-	0	0
49	Mex 68-P-23	CM	2	440569	1985940	-	-	0	0
50	Mex 68-P-23	CM	2	434574	1986397	-	+	0	10
51	Mex 68-P-23	CM	2	424706	2005679	-	-	0	0
52	Mex 69-290	CM	2	440998	1985926	-	-	0	0
53	Mex 69-290	CM	2	435968	1986252	-	-	0	0
54	Mex 69-290	CM	2	433788	2003888	-	-	0	0
55	Mex 79-431	CM	2	439208	1987459	+	-	10	0
56	Mex 79-431	CM	2	432549	1987349	-	-	0	0
57	Mex 79-431	CM	2	437663	1988056	-	-	0	0
58	RD 75-11	CM	2	439113	1987707	-	-	0	0
59	RD 75-11	CM	2	437598	1986221	-	-	0	0
60	RD 75-11	CM	2	424587	2005741	-	-	0	0

Continua en siguiente pagina

No.	Clon	Tipo de suelo	Régimen de humedad	Coordenadas (15Q UTM)		Respuesta serológica		Porcentaje de Incidencia	
				X	Y	X.a	Lxx	X.a.	Lxx
61	CP 72-2086	GL	2	431644	1988014	-	-	0	0
62	CP 72-2086	GL	2	438820	1997127	-	-	0	0
63	CP 72-2086	GL	2	432198	2002722	-	-	0	0
64	Mex 68-P-23	GL	2	432209	2003219	-	-	0	0
65	Mex 68-P-23	GL	2	436917	2000035	+	-	10	0
66	Mex 68-P-23	GL	2	423571	2005601	-	-	0	0
67	Mex 69-290	GL	2	438810	1997014	-	-	0	0
68	Mex 69-290	GL	2	438638	1997739	-	-	0	0
69	Mex 69-290	GL	2	432421	2003194	-	-	0	0
70	Mex 79-431	GL	2	438665	1997657	-	-	0	0
71	Mex 79-431	GL	2	433181	2003184	-	-	0	0
72	Mex 79-431	GL	2	432471	2003198	-	-	0	0
73	RD 75-11	GL	2	431684	1988213	-	+	0	30
74	RD 75-11	GL	2	438661	1996978	-	-	0	0
75	RD 75-11	GL	2	432251	2003199	-	-	0	0
76	CP 72-2086	VR	2	437308	1989186	-	-	0	0
77	CP 72-2086	VR	2	438541	1988304	-	-	0	0
78	CP 72-2086	VR	2	440998	1986158	-	-	0	0
79	Mex 68-P-23	VR	2	436334	1988726	-	-	0	0
80	Mex 68-P-23	VR	2	437297	1989183	-	-	0	0
81	Mex 68-P-23	VR	2	441058	1986080	+	-	20	0
82	Mex 69-290	VR	2	436499	1988789	-	-	0	0
83	Mex 69-290	VR	2	437261	1989175	+	-	10	0
84	Mex 69-290	VR	2	438642	1993479	-	-	0	0
85	Mex 79-431	VR	2	436596	1988923	-	-	0	0
86	Mex 79-431	VR	2	437166	1989169	-	-	0	0
87	Mex 79-431	VR	2	438484	1994660	-	-	0	0
88	RD 75-11	VR	2	437423	1988728	-	+	0	10
89	RD 75-11	VR	2	438651	1988279	-	-	0	0
90	RD 75-11	VR	2	438485	1994634	-	-	0	0

Continua en siguiente pagina

No.	Clon	Tipo de suelo	Régimen de humedad	Coordenadas (15Q UTM)		Respuesta serológica		Porcentaje de Incidencia	
				X	Y	X.a	Lxx	X.a.	Lxx
91	CP 72-2086	FL	2	460760	1996451	-	-	0	0
92	CP 72-2086	FL	2	462519	2001156	-	-	0	0
93	CP 72-2086	FL	2	458568	1975367	-	-	0	0
94	Mex 68-P-23	FL	2	463451	1999564	-	-	0	0
95	Mex 68-P-23	FL	2	462647	2000850	-	-	0	0
96	Mex 68-P-23	FL	2	458159	1982459	-	-	0	0
97	Mex 69-290	FL	2	463290	1999282	-	-	0	0
98	Mex 69-290	FL	2	471168	2001435	-	-	0	0
99	Mex 69-290	FL	2	459861	1982691	-	-	0	0
100	Mex 79-431	FL	2	464089	2000526	-	-	0	0
101	Mex 79-431	FL	2	461732	2002040	-	-	0	0
102	Mex 79-431	FL	2	456695	1976077	-	-	0	0
103	RD 75-11	FL	2	460852	1996065	-	-	0	0
104	RD 75-11	FL	2	468096	2001947	-	-	0	0
105	RD 75-11	FL	2	459551	1976577	-	-	0	0

Nota: Tipo de suelo: CM= Cambisol, VR= Vertisol. GL= Gleysol, FL= Fluvisol
Régimen de humedad: 1 (1793-1936 mm) y 2 (1937-2085 mm)

Anexo 2. Descripción de los clones bajo estudio (Salgado *et al.*, 2013)

CP 72-2086 (CP 62-374 x CP 63-588). Se considera el principal clon cultivado en México, se caracteriza por presentar tallos erectos, color verde avinado en exposición al sol, y verde claro cubierto por la vaina; presenta seras de color blanco y también negra. El diámetro del entrenudo es de 3.0 a 3.5 cm; la yema es mediana, de forma pentagonal y ligeramente abultada; las hojas son erectas, con el ápice curvado y de anchura media; y no tiene ahuates. Este clon cuenta con buena germinación y amacollamiento, despaje regular; de floración temprana (octubre-noviembre) y profusa, motivo por el cual debe cosecharse en diciembre a enero ya que presenta acorchamiento y forma médula; las yemas superiores del tallo producen brotes aéreos. Los mejores rendimientos de campo se tienen en condiciones de cultivo con riego 120 t ha⁻¹ en plantilla y 100 t ha⁻¹ en socas. Se considera resistente a sequía.

Mex 69-290 (Mex 56-476 x Mex 53-142). Este clon ocupa el segundo lugar en superficie cultivada, presenta tallos erectos de color verde crema cuando están cubiertos por la vaina de la hoja, y de color verde claro cuando están expuestos al sol; corteza suave, el tallo es de 2.5 a 3.0 cm de diámetro; yema redondeada, con el poro germinal central abultado. Ocasionalmente toca el anillo de crecimiento y a veces presenta yemas dobles asimétricas; hojas arqueadas, de anchura media, color verde claro, ahuates escasos; raíces profundas y abundantes. Es de regular germinación y amacollamiento temprano, con buen desarrollo cuando se siembra en la época adecuada; regular despaje, las hojas permanecen adheridas al tallo y se desprenden fácilmente con la mano; resistente al acame y susceptible al quiebre de los tallos por los vientos fuertes; floración nula o escasa; se adapta a condiciones de riego o de temporal con precipitación anual superior a 1500 mm y altitud de 0 a 800 msnm. Los rendimientos promedios de campo están entre 100 t ha⁻¹ en plantilla y 92 t ha⁻¹ en socas.

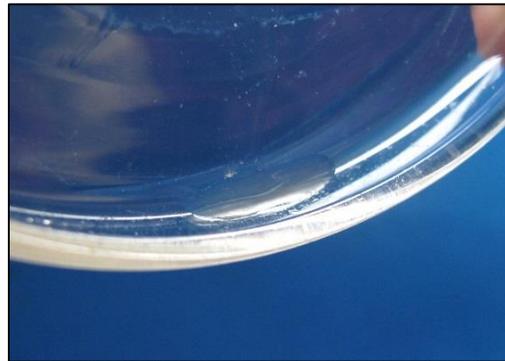
Mex 79-431 (Co421 x Mex 57-473). Tallo de medio a grueso, color verde crema cuando está cubierto por la vaina y verde amarillento cuando está expuesto al sol. Entrenudos de forma cilíndrica; yema abultada de forma pentagonal; hojas arqueadas de anchura media y color verde; la vaina es verde con tintes morados en la base y ausencia de ahuates. Es de buena germinación y buen amacollamiento, con buena apariencia aun en condiciones adversas de sequía; excelente soqueo, floración escasa a regular, siendo particular el hecho de que los mayores porcentajes de floración ocurren en altitudes medias (400-800 msnm). En cambio, es menor en zonas por encima de los 1000 msnm o más cerca del nivel del mar. Se considera un clon de alto rendimiento, 100 t ha⁻¹ bajo condiciones de riego.

Mex 68-P-23 (Mex 59-89 x ?). Este clon tiene un buen comportamiento cuando se cultiva en suelos delgados de mediana fertilidad (Leptosol, Chernozem, Phaeozem, y Regosol); es resistente a la sequía, presenta buen soqueo y no florea. Se caracteriza por su hábito de crecimiento erecto. La copa es mediana y el tallo de color amarillo verdoso, de grosor medio, con entrenudos cilíndricos, yema abultada, hojas arqueadas de color verde normal, con presencia de algunos ahuates. Presenta buena germinación y de rápido amacollamiento, despaja con facilidad, resistente al acame y no se quiebra. Por su resistencia a la sequía, se adapta al temporal con precipitaciones de 1200 a 1600 mm; se desarrolla mejor en zonas por debajo de los 500 msnm. Su rendimiento es mayor a 100 t ha⁻¹ en plantilla y 80 t ha⁻¹ en socas.

RD 75-11 (CB 38-22 x CP 57-603). Tallos inclinados de color verde amarillento cuando están expuestos al sol, y color verde crema cuando están cubiertos por la vaina; el canuto es cilíndrico, de 14 cm de longitud y 4.2 cm de diámetro; el tallo presenta escasa cantidad de cera, cicatriz foliar oblicua y grietas de crecimiento en los tercios inferior u medio. Yema redonda, hojas curvas de color verde pálido y 6.5 cm de ancho, escasa cantidad de ahuates, copa de tamaño grande, regular despaje y poco floración, menor al 5%. Prospera bien en condiciones de temporal y rinde

más de 100 t ha⁻¹ en plantilla en los ingenios donde es cultivada en Tabasco. Es de mediana germinación, presenta poca brotación de yemas, es susceptible al acame cuando hay presencia de vientos fuertes en la zona.

Anexo 3. Equipo utilizado para la extracción de jugo a partir de los entrenudos de los tallos colectados en los 105 puntos de muestreo.



Anexo 4. Fotografías de las membranas de nitrocelulosa reveladas y empleadas en el análisis serológico.

