

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

***Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson: susceptibilidad de los cultivares e impactos en el rendimiento azucarero**

***Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson: cultivars susceptibility and effects in the sugar yield**

Yosel Pérez Pérez, José Ramón Pérez Milán, María de la Luz La O Echevarría, Roberto González Hernández y Yenima Pellón Guzmán

Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar. Carretera CUJAE Km 2½, Boyeros, La Habana, Cuba. CP 19390

E-mail: yosel.perez@epicamt.azcuba.cu

RESUMEN

Los efectos producidos por *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson sobre los tallos con síntomas agudos de la escaldadura foliar de la caña de azúcar, han sido abordados por diferentes autores, sin embargo, se desconocen las afectaciones que pueden producirse en tallos asintomáticos seropositivos a la bacteria. Este trabajo tiene como objetivo estudiar el impacto de la presencia de la bacteria en los tejidos colonizados, así como la relación existente entre la concentración de células y la expresión de síntomas. En 900 tallos de 14 cultivares se detectó la bacteria por serología y determinaron las variables Brix del tallo con refractómetro de mano, así como los contenidos de fructosa, glucosa y sacarosa, para lo que se utilizó la técnica Cromatografía Líquida de alta resolución. Se determinó que la presencia de la bacteria *X. albilineans* en tallos asintomáticos afecta el contenido azucarero de los mismos, lo cual constituye un aporte al conocimiento de las relaciones patógeno – hospedante para esta enfermedad. Los tallos son colonizados por la bacteria, pero la cantidad de unidades formadoras de colonia por gramo de tejido o de jugo no significa que un cultivar sea más o menos susceptible; en los tallos con síntomas, la densidad de células aumenta hacia el follaje, mientras que en los asintomáticos ocurre lo contrario.

Palabras clave: azúcares, cultivares, colonización, *Xanthomonas albilineans*

ABSTRACT

The effects produced by the *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson on stalks with acute symptoms of the disease have been addressed by different authors, however, is unknown the effects that may occur in seropositive asymptomatic stems to the bacteria. This work has as objective to study the impact of the presence of bacteria in the colonized tissues, as well as the relationship between the concentration of cells and the expression of symptoms. In 900 stems of 14 cultivars detected the bacteria by serology and identified the variables Brix of stem with handheld refractometer, as well as the contents of fructose, glucose and sucrose with High Performance Liquid Chromatographic. The presence of the bacterium *X. albilineans* in

asymptomatic stems affects the sugar content of the same, which constitutes a contribution to the knowledge of the pathogen - host relations for this disease. The stems are colonized by the bacteria, but the amount of UFC/g of tissue or per ml/juice does not mean that a cultivar is more or less susceptible. In stalks with symptoms the cell density increases toward the foliage, while that in the asymptomatic happens to the contrary.

Keywords: sugars, cultivars, colonization, *Xanthomonas albilineans*

INTRODUCCIÓN

Los efectos perjudiciales que *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, ocasiona sobre la producción y el deterioro de tallos con síntomas de la escaldadura foliar, debido al brote de yemas laterales y la muerte súbita de las plantas, trae como consecuencia la destrucción en pocos meses de un campo plantado con cultivares susceptibles. Además, puede reducir el tonelaje de caña, lo que ha sido documentado por diferentes autores. Chávez (2000) informa de la muerte del 10 % de la población de tallos en cultivares susceptibles como Mex64-1487 y Mex80-1298, en México. Igualmente, Garcés y Valladares (2006) calcularon reducciones del rendimiento agrícola del 34 % en Ecuador.

Según Huerta *et al.* (2003) bajo condiciones controladas e inoculación artificial, la afectación del rendimiento en cultivares susceptibles oscila entre 12,0 y 14,5 t ha⁻¹. Por eso, la composición de variedades es un factor importante en el nivel de daño que se registra por el ataque de la escaldadura foliar (Chinea y Rodríguez, 2010).

La forma y factores que intervienen en la propagación y comportamiento epifítico de *X. albilineans* han sido sistemáticamente abordados (Champoiseau *et al.*, 2008) y aunque son conocidos los efectos de la enfermedad en tallos con síntomas, no están documentados los efectos de la bacteria cuando se encuentran en tallos asintomáticos.

Este trabajo tiene como objetivo estudiar el impacto de la presencia de la bacteria en los tejidos colonizados, así como la relación existente entre la concentración de células y la expresión de síntomas.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el año 2011 se muestrearon 13 provincias, para lo cual se seleccionaron al azar 36 campos comerciales de caña de azúcar, con diferentes números de cosechas, utilizando el método de muestreo de cinco puntos. Por cada punto se

evaluaron de cinco plantas, un tallo al azar, lo que sumó un total de 180 puntos y 900 tallos de los cultivares: C86-503, C132-81, C90-469, C86-56, C86-531, C86-12, C87-252, C1051-73, C85-102, C87-51, C90-317, CP52-43, SP70-1284 y C88-380.

Todos los tallos afectados por barrenadores fueron discriminados y en los seleccionados con los síntomas típicos de la escaldadura foliar se midieron las variables: presencia de *X. albilineans*, altura y diámetro del tallo (cm), Brix del jugo del tercio medio del tallo (con un refractómetro de mano). Las muestras de jugo se secaron y resuspendieron en 1/3 del volumen inicial para ser analizadas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Knauer), con una columna de Eurokat Ca 10 µm 300*8 mm y un detector Chiral. La concentración de sacarosa, glucosa y fructosa se determinó por cuantificación con el método del estándar externo de rafinosa (1 mg ml⁻¹). Los resultados fueron expresados como porcentaje de peso/peso y se compararon mediante el paquete estadístico ChromGate 2,8.

La detección de la bacteria fue realizada mediante serología a través del Sistema Ultramicroanalítica (SUMA), usando un juego comercial (AGDIA). Los controles positivos empleados fueron previamente diagnosticados por los métodos de PCR anidado y microbiológicos y los negativos, fueron los recomendados por el fabricante.

Se realizó un análisis discriminante a las variables: Brix del tallo, contenido de glucosa, fructosa y sacarosa para buscar la asociación entre el grado de infección de *X. albilineans* y los parámetros analizados. Para eso se utilizó el *software* R versión 2.2.0.

La colonización de los tallos por la bacteria se realizó en parcelas experimentales de la Estación Provincial de Investigaciones de la Caña de Azúcar, Matanzas. Se tomaron tres tallos no inoculados, tres asintomáticos y tres con síntomas severos de la enfermedad (Figura 1), de los cultivares de caña de azúcar C87-51, C89-147 y L55-5. Cada tallo representó una réplica

y se empleó como control, tallos inoculados y no inoculados del cultivar My5514 de 10 meses de edad, debido a que el mismo es utilizado hasta ahora en las pruebas de resistencia, como patrón resistente a escaldadura foliar (Jorge *et al.*, 2011). Las muestras se protegieron con papel húmedo y fueron procesadas inmediatamente en el laboratorio para evitar cambios del tejido por almacenamiento. Al aislar la bacteria se tomaron muestras de plantas enfermas y asintomáticas, considerando los siguientes tratamientos:

- Base de tallos enfermos (obtenidos del segundo entrenudo más cercano a la superficie del suelo)
- Base de tallos asintomáticos (obtenidos del segundo entrenudo más cercano a la superficie del suelo)
- Ápice de tallos enfermos (obtenidos del último entrenudo más cercano al punto de crecimiento)
- Ápice de tallos asintomáticos (obtenidos del último entrenudo más cercano al punto de crecimiento)
- Hoja +3 de tallos enfermos
- Hoja +3 de tallos asintomáticos

Después de obtenidas ambas muestras (tallos y hojas) se procedió a realizar diluciones seriadas, primeramente desde 10^{-1} (Figura 2) hasta 10^{-8} ; cuando se realizaron las primeras siembras exploratorias en placas de Petri, se seleccionó 10^{-6} (Figura 3), debido a que facilitó el conteo de las unidades formadoras de colonias (ufc). Posteriormente se sembró por agotamiento 0,1 ml en las placas. Para lograr un crecimiento limpio (pocas contaminaciones) el medio seleccionado fue Wilbrink, al que se le adicionó un suplemento de 2 mg L^{-1} de benomyl y 100 mg L^{-1} de cyclohexamida, lo que limita

el crecimiento de hongo y algunas bacterias saprófitas. Cuando se observó el crecimiento de bacterias, tres a cinco días posteriores a la siembra, se contaron las colonias en las tres réplicas de cada tratamiento (empleando un contador de colonias). Ulteriormente, se determinó las ufc (Ecuación).

$$UFC = N * D \left(\frac{1}{10^6} \right) * Ms \left(\frac{1}{10} \right) \quad (1)$$

donde,

- Ufc= unidades formadoras de colonias por mililitro de jugo o gramo de tejido fresco, según el caso (tallo u hoja respectivamente)
- N = número de colonias contadas
- D = dilución en la que se trabajó
- Ms = volumen en mililitros empleados para la siembra (0,1)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los parámetros estudiados fueron afectados por la presencia de la bacteria (Tabla 1). La afectación encontrada en los componentes del rendimiento industrial, Brix del tallo y contenidos de sacarosa, glucosa y fructosa, son atribuidos a la presencia de *X. albilineans* en los mismos, pues, la otra bacteria que afecta los haces vasculares de los tallos propagada en Cuba encontrada (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente causal del raquitismo de los retoños) no afecta el contenido azucarero de los tallos (Pérez-Milian, 1985). Al mismo tiempo, el hecho de que todos estos parámetros incluidos en el análisis discriminante se ajusten al modelo, también explica la asociación con los grupos de alta y baja incidencia de la bacteria y por tanto, constituye un indicador importante para evaluar la respuesta productiva de algunos cultivares. Del



Figura 1. Síntomas agudos de escaldadura en L55-5

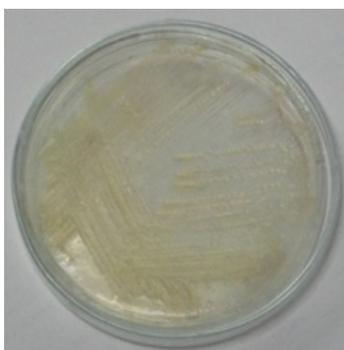


Figura 2. Aislamiento a partir de dilución 10^{-1}

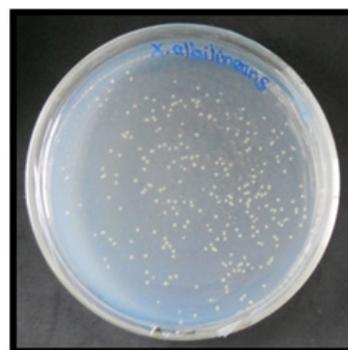


Figura 3. Aislamiento a partir de dilución 10^{-6}

Tabla 1. Resultados del Análisis Discriminante para los parámetros del rendimiento azucarero

Función	Valor Eje	Wilke Lambda	X2	GL	Significancia
1	1,17344	0,730 c	0,092	0,094 ab	8,21 a
Coeficientes Estandarizados		MATRIZ DE CLASIFICACIÓN			
Variable	Raíz				
Fructosa	0,709587	Filas: Clasificación observada			
Glucosa	-0,814285	Columnas: Clasificación pronosticada			
Sacarosa	0,85708	Porcentaje Correcto	G_1	G_2	
Brix-tallo	0,210395	G_1	100	1 13	0
Altura del tallo	0,330913	G_2	75	4	12
%	100	Total	86,21	17	12

mismo modo, se destaca el elevado porcentaje de buena clasificación para los parámetros incluidos en el análisis realizado (86,21 %).

Hasta ahora no se ha encontrado documentación sobre la influencia que ejerce la presencia de la bacteria en el contenido azucarero, sin embargo, Mensi *et al.* (2014) reportan que la bacteria *X. albilineans* ha sido observada en las células del floema, así como en las del parénquima vascular, llamadas también células de almacenamiento. Estos elementos son suficientes para sustentar una hipótesis donde se exponga que la presencia de la

bacteria en tallos asintomáticos puede afectar el rendimiento de los mismos.

Los tejidos pueden ser colonizados en tallos asintomáticos y enfermos, pero como se observa en los tres cultivares infectados de forma natural (C89-147, L55-5 y C87-51), dentro de los tallos con síntomas, la cantidad de ufc siempre resulta superior hacia el ápice o la hoja +3, lo que es contrario a los tallos asintomáticos (Tabla 2). Este mismo comportamiento se observó en el control My5514, donde la mayor concentración de bacterias se contabilizó en los tallos inoculados.

Tabla 2. Cantidad promedio de unidades formadoras de colonias por mililitro de jugo en el tallo o ufc/g de tejido fresco en la hoja +3

Cultivar	Severidad*	Conteo de células de <i>X. albilineans</i> en diferentes partes de la planta		
		Base	Ápice	Hoja +3
C 89-147	5	26,583x106	63,610 x106	49,408 x106
	1	54,17 x106	31 x106	18,545 x106
L 55-5	5	2,99 x106	6,952 x106	3,332 x106
	1	214,3,x103	0	0
C 87-51	5	31,900 x106	76 x106	49,246 x106
	1	51,071x106	58,143 x106	13,342106
My 5514	5	4,571 x106	2,378 x106	18,250 x106
	1	248,4 x 103	213,9 x103	285 x103

Leyenda: 5 - máxima severidad, 1 - tallos asintomáticos

* Según fórmula propuesta por Rott y Davis (2000) para el cálculo de la severidad

El cultivar altamente susceptible L55-5 presentó menor concentración de células tanto en el jugo del tallo como en el tejido foliar afectado. Sobre las plantas asintomáticas solo se observó la colonización en la base del tallo y no en el ápice

u hojas, lo cual resulta muy interesante, debido a que puede inferirse que la presencia de la bacteria en el mismo es suficiente para la exhibición de los síntomas asociados a la enfermedad.

Los resultados expuestos no coinciden con

Huerta *et al.* (2003a) pues estos autores refieren que el nivel de colonización de los tallos o la densidad de unidades formadoras de colonia (ufc) por gramo de tejido fresco puede ser utilizado como una evidencia para calificar la resistencia de los cultivares de caña de azúcar frente al agente patógeno de la escaldadura foliar. En este sentido, varios autores le conceden particular importancia a algunos factores ambientales como la lluvia, al referir que la aparición de los síntomas se correlaciona con el comportamiento de ciertos eventos meteorológicos, pero no con la colonización de los tallos (Champoiseau, 2006).

CONCLUSIONES

1. La presencia de la bacteria *X. albilineans* en tallos asintomáticos afectó el contenido azucarero de los mismos, lo cual constituye un aporte al conocimiento de las relaciones patógeno - hospedante.
2. En los tallos asintomáticos (seropositivos a *X. albilineans*) la mayor densidad de unidades formadoras de colonia se localizó hacia la base de los tallos, mientras que en los que exhiben síntomas ocurre lo contrario.
3. El cultivar L55-5, expresó los síntomas agudos de la enfermedad con baja densidad de células bacterianas en el tejido y/o el jugo, contrario a lo ocurrido con el resto de los cultivares estudiados.

BIBLIOGRAFÍA

- ACHAMPOISEAU, P. *Xanthomonas albilineans*, l'agent causal de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre: caractérisation et variabilité génétique du pouvoir pathogène, en Guadeloupe et dans le monde. Ph D Thesis, Life Sciences. Université des Antilles et de la Guyane, Guadeloupe, France. 2006, 171 pp.
- CHÁVEZ, M.R. Proyecto para determinar la resistencia varietal al mosaico, la roya, el carbón y la escaldadura de la Caña de Azúcar. Resistencia varietal a la enfermedad escaldadura de la caña de azúcar (*Xanthomonas albilineans*). Programa Nacional de Variedades del FOCITCAÑA. México, D. F.: 2000, 85 p.
- CHINEA, M.A. y E.L. Rodríguez. Enfermedades de la caña de azúcar (en edición). Dpto. Protección de Plantas, INICA, MINAZ. La Habana, Cuba. 2010, 150 p.
- GARCÉS, F. y C. VALLADARES. La desinfección de herramientas: una medida preventiva para el manejo de la escaldadura de la hoja y el raquitismo de la soca. Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador (CINCAE). *Carta Informativa*, 8 (2): 1-4, 2006.
- HUERTA, M., J.S. SANDOVAL, E. CÁRDENAS, R.I. ROJAS, S. FLORES, M. MARÍN. Evaluación de resistencia de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) Co997 y Mex64-1487 analizando colonización y dinámica poblacional de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson en tallos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21 (2): 316-322, 2003.
- HUERTA, M., L.D. ORTEGA, C. LANDEROS, L. FUCIKOVSKY, M. MARÍN. Resistencia de variedades comerciales de caña de azúcar a la escaldadura de la hoja *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson. Colegio de Posgraduados. Texcoco, México, *Agrociencia*, 37 (5): 511-519, 2003a.
- JORGE, H., R. GONZÁLEZ, M. CASAS, I. JORGE. Normas y Procedimientos del Programa de Fitomejoramiento de la Caña de Azúcar en Cuba. PUBLINICA, La Habana, Cuba. 2011, 308 p.
- MENSI, I., M.S. VERNEREY, D. GARGANI, M. NICOLE, P. ROTT. Breaking dogmas: the plant vascular pathogen *Xanthomonas albilineans* is able to invade non-vascular tissues despite its reduced genome. *Open Biol.*, 4: 130116, 2014. Doi://dx.doi.org/10.1098/rsob.130116.
- PÉREZ-MILIAN, J.R. El Raquitismo de los Retoños de la Caña de Azúcar en Cuba. Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias. Academia de Ciencias de Cuba, La Habana, Cuba. 1985, 120 p.
- ROTT, P. y M.J. DAVIS. Leaf scald. In: J.C. COMSTOCK, A.S. SAUMTALLY, P. ROTT, R.A. BAILEY, B.J. CROFT. A guide to Sugarcane diseases. CIRAD and ISSCT, Montpellier, France. 2000, pp. 163-169. ISBN: 978-2-87614-386-9.