



Universidad de Matanzas
Facultad de Ciencias Agropecuarias



**Tesis presentada en opción al Título Académico de
Máster en Ciencias Agrícolas**

**Estudios sobre el organismo causal de la
escaldadura foliar de la caña de azúcar**

Autor: Ing. Yenima Pellón Guzmán

Tutores: Dr.C. José R. Pérez Milian

MSc. Yosel Pérez Pérez

Matanzas

2018

Nota de aceptación

Presidente del Tribunal

Tribunal

Tribunal

Ciudad y fecha

Declaración de autoridad

Declaro que soy el único autor de este trabajo y como tal autorizo a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Matanzas y al Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar a hacer, en dependencia de su importancia, contenido y estructura, la utilización que estimen pertinente del mismo.

Ing. Yenima Pellón Guzmán

Opinión del tutor

La tesis presentada por la Ing. Yenima Pellón Guzmán aborda una temática de suma importancia para los estudios de la fitosanidad de la caña de azúcar de forma general y en particular para nuestro País, debido al impacto demostrado por la enfermedad estudiada durante los últimos. La Aspirante ha elaborado su Documento de Maestría a partir de los resultados obtenidos en el laboratorio de diagnóstico de la EPICA Matanzas, donde ella labora por más de 10 años, en colaboración con el Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA) de Cuba y la Estación Experimental de la Caña de Azúcar Obispo Colombres de la República Argentina. En esta actividad, la aspirante posee conocimientos y experiencia adquirida durante el desempeño de su labor sistemática. Sus conclusiones se corresponden con las tendencias mundiales en esta materia que obviamente cambiará en el futuro algunos conceptos relacionados con este tema. Tomando en consideración estos elementos y la participación personal de la Aspirante en la conducción del protocolo diseñado, solicito al Tribunal, que sea justo en la calificación del ejercicio de defensa.

Dado en Jovellanos, Matanzas a los 31 días del mes de mayo de 2018, y como constancia firmo la presente.

Dr. C. José R. Pérez Milian, Investigador Titular
Tutor

Dedicatoria

A MIS DOS SOLES

SHEILA

Y

FRANK DAVID

Agradecimientos

Resulta difícil encontrar palabras de gratitud para expresar mis más sinceros agradecimientos a todas las personas que aportaron su granito de arena para hacer realidad mis sueños.

A la Revolución por brindarme la posibilidad de formarme profesionalmente.

A mis tutores José R. Pérez Milián y Yosel Pérez Pérez, por confiar en mí, para la realización de esta tesis y sus horas dedicadas a trasmitirme ese caudal de conocimientos.

A Freddy y mis niños por apoyarme incondicionalmente.

A mi amiga Madyú, quien sacrificó sus horas de descanso para revisar cada detalle de la tesis y trasmitirme siempre sus conocimientos y optimismo.

A Leticia, quien a pesar de su gran responsabilidad, siempre organizó su agenda para poder atenderme.

A Enildo por su comprensión y apoyo.

A China por su ayuda y sugerencias

A mis compañeros de trabajo por su constante preocupación, a Yanetsis, Dania, Cuadras, Yilian, Carvajal, Lisset y Yoanys.

A todos, infinitas gracias.

Pensamiento



"...Nuevas enfermedades surgen, se extienden; el cambio de clima impone a los hombres una lucha tremenda y muy especialmente a los científicos..."

Fidel Castro, 1997

Síntesis

En la presente tesis se realizó la evaluación de colonias de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, organismo causal de la enfermedad escaldadura foliar de la caña de azúcar, aisladas de plantas con y sin síntomas en las provincias Mayabeque, Matanzas, Camagüey y Las Tunas. Las muestras se seleccionaron al azar tres campos de una Unidad Empresarial de Base (UEB) en cada una de las provincias. En el muestreo sobre cerrado se incluyeron plantas con síntomas asociados a la enfermedad (rayado de las hojas, brotes de yemas laterales, muerte del cogollo, etc.) así como tallos asintomáticos. El diagnóstico de la enfermedad se realizó a través de la sintomatología y la técnica serológica UMELISA-DAS. Se estudió el perfil morfológico, bioquímico, patogénico y molecular de los aislados. Los resultados mostraron que la bacteria está propagada en todos los territorios estudiados con más de 40% de las muestras de forma asintomática. La provincia Camagüey mostró mayor número de plantas con síntomas de la enfermedad (21% de infección) con diferencias significativas con respecto al resto de las provincias ($p \leq 0,05$ según el test exacto de Fisher para tablas de contingencia y la regresión logística monovariada). En Las Tunas se registró el 10% de las muestras con síntomas, mientras que en Mayabeque y Matanzas no se registraron. No se encontró correspondencia entre la propagación de la bacteria y el número de cosechas de los campos y no se logró establecer diferencias morfológicas y bioquímicas entre los aislados de las plantas con y sin síntomas en las provincias estudiadas. La bacteria aislada de las cuatro provincias evaluadas presentó 100% de homología con la cepa GPE PC73 de Guadalupe, KO 905 de Estados Unidos y el gen del ARN ribosomal 23S de Brasil.

Tabla de Contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Caña de azúcar	5
2.2 La escaldadura foliar	5
2.2.1 Organismo causal	6
2.3 Síntomas de la escaldadura foliar	7
2.3.1 Forma crónica	7
2.3.2 Forma aguda	8
2.3.3 Fases de latencia y eclipse	9
2.4 Histopatología	10
2.5 Transmisión y hospedantes	11
2.6 Influencia de las condiciones ambientales	12
2.7 Variabilidad de <i>Xanthomonas albilineans</i>	12
2.8 Susceptibilidad de los cultivares	13
2.9 Control	14
2.9.1 Cultivo de ápices meristemáticos	16
2.9.2 Termoterapia	16
2.9.3 La combinación de termoterapia con el cultivo de meristemas	16
2.9.4 Electroterapia	17
2.10 Diagnóstico e identificación de la escaldadura foliar de la caña de azúcar ...	17
2.10.1 Observación visual de los síntomas	17
2.10.2 Aislamiento en medio de cultivo.	17
2.10.3 Diagnóstico serológico	18
2.10.4 Diagnóstico molecular	19
2.11 Influencia de la enfermedad en los rendimientos agrícola y azucarero	20
2.12 Situación de la escaldadura foliar en Cuba	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1 Diseminación de <i>Xanthomonas albilineans</i> en áreas comerciales	24
3.1.1 Presencia de los síntomas de la escaldadura foliar en los campos muestreados	24
3.1.2 Presencia de la escaldadura foliar en tallos asintomáticos en los campos muestreados	25

3.1.3. Relación de la infección de los campos con el rendimiento estimado y el número de cosechas.	26
3.2. Identificación y caracterización de aislamientos.....	27
3.2.1 Muestreo y aislamientos	27
3.2.2 Caracterización morfológica.....	28
3.2.3 Caracterización bioquímica	28
3.2.4 Evaluación serológica	28
3.2.5 Evaluación patogénica	28
3.2.6 Caracterización molecular	29
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1 Diseminación de <i>Xanthomonas albilineans</i> en áreas comerciales.....	34
4.1.1 Presencia de los síntomas de la escaldadura foliar en los campos muestreados	34
4.1.2 Presencia de la escaldadura foliar en tallos asintomáticos en los campos muestreados.....	35
4.1.3 Relación de la infección de los campos con el rendimiento estimado y el número de cosechas.	37
4.2. Identificación y caracterización de aislamientos.....	40
4.2.1. Muestreo y aislamientos	40
4.2.2. Caracterización morfológica.....	40
4.2.3 Caracterización bioquímica	41
4.2.4 Evaluación serológica	43
4.2.5 Evaluación patogénica	45
4.2.6 Caracterización molecular	48
5. CONCLUSIONES	54
6. RECOMENDACIONES.....	55
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

1. INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar, se considera el cultivo agrícola más importante de la humanidad (D'Agostini *et al.*, 2015) y constituye una fuente de alimentación de alto valor (Chávez, 2008; Martin, 2014).

De acuerdo con informes de la Organización Mundial para la Alimentación de las Naciones Unidas (FAO, 2016), su cultivo se extiende por cerca de 21 millones de hectáreas en el mundo, con oscilaciones en la producción, que dependen de las condiciones suelo-climáticas, las tecnologías aplicadas y la incidencia de plagas.

La escaldadura foliar, causada por *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, se encuentra entre las principales enfermedades que afectan el cultivo. Las particularidades de la taxonomía, ecología y patogenicidad de la bacteria, le confiere un carácter letal respecto a otras especies del género, de ahí su alta peligrosidad y la vigilancia permanente que se mantiene sobre la misma (Pieretti *et al.* 2015).

La bacteria coloniza los haces fibrovasculares de los tallos y hojas, se moviliza sistemáticamente dentro de los tejidos de las plantas y se manifiesta de forma diferente, con síntomas variables de acuerdo a las condiciones locales (Pieretti *et al.*, 2015; Rossetto y Díaz, 2015) e infecciones que no se manifiestan, que confieren inseguridad al diagnóstico visual.

Numerosos brotes de esta enfermedad se han registrado en diferentes áreas cañeras del mundo y se ha informado en más de 65 países, con pérdidas significativas en genotipos altamente susceptibles (Rott y Davis, 2000).

La producción de azúcar puede afectarse entre 0,5 y 1% (Pérez *et al.*, 2002; Barroso, 2008) relacionadas, en gran medida, con la resistencia de los cultivares y la agresividad del organismo patógeno.

En Cuba a finales de la década del setenta del pasado siglo, se detectó su presencia en siete provincias (Rivera *et al.* 1979). Años más tarde se informaron

infecciones latentes en plantas micropropagadas y plantaciones comerciales y se señaló el peligro del resurgimiento de la enfermedad (Peralta *et al.*, 1997), sin que se esclarecieran las causas, aunque se mantuvo como enfermedad en cuarentena.

La aparición de un brote severo de la enfermedad en el banco de germoplasma del INICA en 1998, condujo a nuevas estrategias para su manejo. Se detectó la presencia de la enfermedad en campos comerciales y áreas de investigación, se incluyó la resistencia varietal como alternativa de control, dentro del Programa de obtención de nuevos cultivares y se diseñó un conjunto de investigaciones para sustentarla científicamente.

La variabilidad del patógeno y la pérdida de la resistencia varietal restan efectividad al control a través de la mejora genética (De Sousa y Silva, 2005) de ahí la necesidad de determinar las variantes patogénicas, su distribución y niveles de agresividad.

Al valorar la resistencia genética dentro de la estrategia de manejo de la enfermedad, se hace necesario establecer los procedimientos para una determinación rápida, práctica y no sesgada del comportamiento de los cultivares que se evalúen, basados hasta el presente en las experiencias internacionales.

El análisis de los aspectos antes abordados permitió identificar el siguiente problema científico.

Problema Científico

La amplia distribución de la escaldadura foliar de la caña de azúcar en Cuba hace necesario evaluar las posibles variaciones del organismo causal.

Con vistas a dar respuesta a la problemática anterior, se planteó la siguiente:

Hipótesis

El análisis de indicadores morfológicos, bioquímicos, patogénicos, serológicos y moleculares de aislamientos de *Xanthomonas albilineans* obtenidas en cuatro provincias, permitirá identificar posibles variaciones genotípicas del organismo causal.

Objetivo General

Evaluar el nivel de infección de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, organismo causal de la enfermedad escaldadura foliar de la caña de azúcar, aisladas de plantas con síntomas y asintomáticas en Mayabeque, Matanzas, Camagüey y las Tunas.

Objetivos específicos

- Evaluar la incidencia de la enfermedad en plantas de caña de azúcar con y sin síntomas en las provincias Mayabeque, Matanzas, Camagüey y Las Tunas.
- Caracterizar los aislamientos obtenidos desde el punto de vista morfológico, bioquímico, serológico, patogénico y molecular.
- Identificar la relación de los fragmentos de ADN de las cepas de *Xanthomonas albilineans* obtenidas con los informados en el Banco Internacional de genes (Gen Bank).

Novedad científica

- Se logró la reproducción de los síntomas de la escaldadura en plantas inoculadas con aislados obtenidos de tallos asintomáticos en condiciones naturales.
- Se comprobó la homología entre el fragmento de ADN de la variante patogénica circulante en Cuba, con otras cepas de nuestra área geográfica.

- Se depositó la secuencia de ADN obtenida de los aislamientos cubanos en el Banco Internacional de Genes (GenBank)

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Caña de azúcar

La caña de azúcar, *Saccharum spp.*, es un cultivo prioritario desde el punto de vista económico y social, por constituir una importante fuente de empleo directo en el campo y la industria, en regiones tropicales y subtropicales, por lo que está expuesto a la acción de factores bióticos y abióticos, los cuales inciden directamente en los rendimientos. Las enfermedades de este cultivo, constituyen un factor de reconocida importancia (Chinea *et al.*, 2000; Jiménez *et al.*, 2004).

2.2 La escaldadura foliar

La escaldadura foliar se considera una de las enfermedades más importantes de la caña de azúcar en Brasil y de las de mayor impacto a nivel mundial (Bressiani *et al.* 2007). Causa grandes pérdidas e incluso, la destrucción total, en pocos años, de cultivares susceptibles.

La enfermedad fue observada por primera vez en Indonesia en el año 1920 y durante varios años se propagó con gran intensidad lo que determinó la proscripción de numerosas variedades en diferentes áreas cañeras del mundo (Chinea *et al.* 1994). Fue reconocida como una enfermedad vascular bacteriana ese mismo año, gracias a las investigaciones realizadas por Wilbrink en Java y North en Australia y Fiji, (Martin y Robinson, 1961). Los primeros indicios de la enfermedad sustentan la posibilidad de que estuviera presente antes de ser reconocida por su similitud con otros desórdenes o debido a las frecuentes infecciones latentes (Ricaud y Ryan, 1989).

A inicios del siglo XX se informaron grandes pérdidas en cañas nobles susceptibles, las cuales se distribuyeron por todo el mundo, lo que favoreció la diseminación del patógeno, al no existir adecuadas medidas de cuarentena. La enfermedad se controló reemplazando las cañas nobles susceptibles por cultivares resistentes, sin embargo, en 1961 ya se informaba la presencia del

patógeno en países como Filipinas, Mauricio y Hawái, según Martin y Robinson (1961).

2.2.1 Organismo causal

Según Ricaud y Ryan, (1989); Wilbrink y North descubrieron que la escaldadura era causada por una bacteria en forma de bacilo, aunque no pudieron nombrarla debido a dificultades para teñir el flagelo polar. En 1943, Dowson reclasificó las bacterias fitopatógenas con un flagelo polar que producían pigmentos amarillos, y se incluyó en el género *Xanthomonas* especie *albilineans* debido a la producción de una toxina llamada albicidina (Martin y Robinson, 1961).

Tanto Holt *et al.* (1994) como China y Milanés (2008), plantean que la bacteria que causa la escaldadura presenta forma de varilla corta Gram negativa, con dimensiones de 0,25-0,3 μm por 0,6-1,0 μm y puede presentarse como células aisladas o formando cadenas. Posee movilidad mediante un flagelo polar y forma colonias amarillas viscosas, pero no mucoides. Es un microorganismo aerobio y entre sus características bioquímicas se puede mencionar que hidroliza la esculina, crece sobre leche, pero es incapaz de descomponer las proteínas.

No crece sobre sales de amonio, nitratos o asparagina, como fuentes de nitrógeno. No reduce los nitratos a nitritos, produce invertasa pero no ureasa y requiere metionina para su crecimiento normal; se desarrolla a 25°C y su temperatura óptima de crecimiento es 28°C. Produce una toxina llamada albicidina, que bloquea la diferenciación de cloroplastos, lo que resulta en la aparición de los síntomas característicos de la enfermedad (Rott *et al.* 2010).

Sobre la base de las características señaladas, la posición sistemática asumida para esta bacteria por el Centro Internacional de Biociencias Agrícolas (CABI, 2011), es la siguiente:

Reino: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: *Xanthomonadales*

Familia: *Xanthomonadaceae*

Género: *Xanthomonas*

Especie: *albilineans*

Nombre científico: *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson

Estudios recientes han demostrado que de acuerdo con las especificidades derivadas de los análisis biológicos, bioquímicos, filogenéticos y genómicos, se llega a la conclusión de que su genoma ha experimentado una significativa erosión y constituye un caso singular dentro de la Xanthomonadas (Pieretti *et al.*, 2015; Kretz *et al.*, 2015).

2.3 Síntomas de la escaldadura foliar

La enfermedad se caracteriza por la aparición de rayas largas y estrechas de color blanco, con bordes bien definidos que forman un ángulo agudo con la nervadura central. Bajo condiciones ambientales favorables las yemas laterales brotan y pueden morir los tallos o el plantón completo (Garcés, 2003).

La enfermedad se presenta en dos formas diferenciadas, la crónica y la aguda, pero muy frecuentemente se presentan fases particulares de latencia y eclipse por largos períodos. Las características de estas fases se han descrito detalladamente por diferentes autores (Ricaud y Ryan, 1989; Rott *et al.*, 1995; Davis y Rott, 2000).

2.3.1 Forma crónica

Se caracteriza por síntomas externos; el más típico es la presencia de líneas finas de color blanco en la lámina de la hoja que miden aproximadamente 1-2 mm de ancho. El nombre específico del organismo causal se derivó de la presencia de este síntoma; en ocasiones se presentan puntos necróticos a lo largo de la línea blanca y puede encontrarse clorosis parcial o completa en las hojas afectadas y retoños achaparrados (Matos, 2002).

Según China *et al.* (2000), en los cultivares resistentes y tolerantes sólo se presentan los síntomas de la forma crónica y en muchos de ellos, son tan leves que pueden pasar inadvertidos. Sin embargo, cuando existen condiciones propicias para la propagación y desarrollo de la enfermedad, se puede producir una epifita repentina. Los haces fibrovasculares de los tallos afectados con la forma crónica presentan una coloración rojo brillante, principalmente en la región del nudo, pero también pueden tenerla en toda la longitud de los entrenudos y al avanzar la enfermedad, se pueden formar cavidades prominentes en los tejidos maduros del interior del tallo (Figura 1).



Figura 1. Coloración que frecuentemente muestran los haces fibrovasculares de los tallos colonizados por la bacteria *X. albilineans*.

2.3.2 Forma aguda

Se caracteriza por la presencia de necrosis en el follaje de los tallos en los cuales muchas veces se produce la muerte súbita sin previa expresión de síntomas. En ocasiones, cepas completas o grandes áreas de un campo pueden estar afectadas y casi siempre se observan pequeños brotes en la base del tallo, con la sintomatología típica en las hojas (Figura 2). El comienzo de esta forma de manifestación generalmente se debe a períodos de estrés, especialmente

sequías prolongadas seguidas de períodos de lluvia (Rott y Davis, 1995; Tokeshi, 1997).

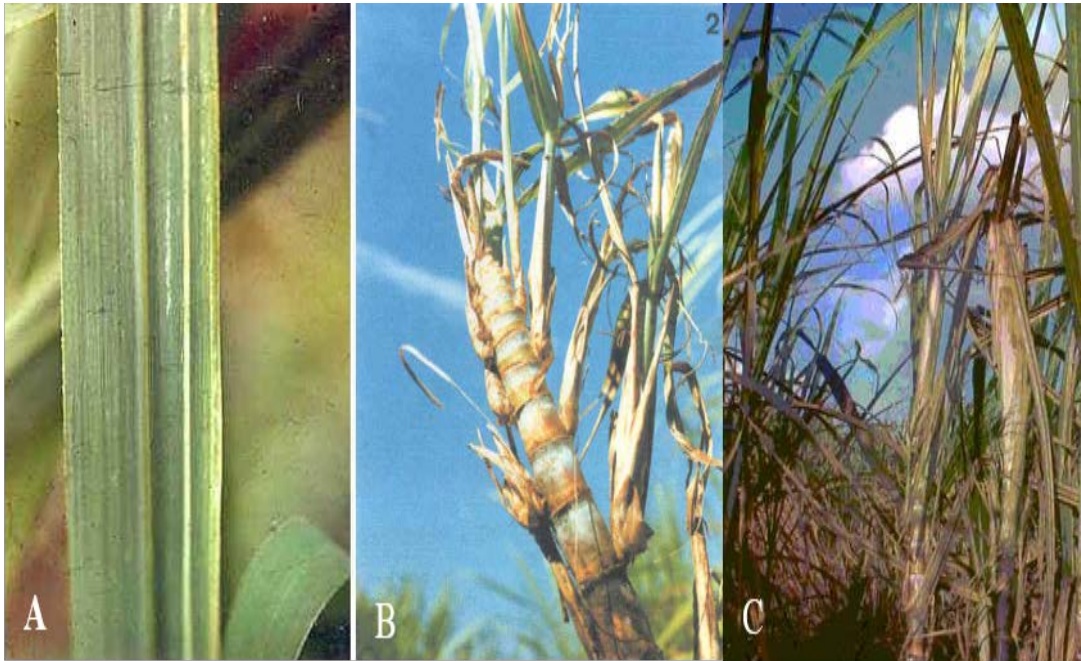


Figura 2. Síntomas de la escaldadura foliar en la forma aguda de la enfermedad. (A) Rayas blancas o necrosadas, formando ángulo con la nervadura central, (B) Brotes laterales (C) Muerte del plantón.

2.3.3 Fases de latencia y eclipse

Latencia: Muchas plantas infectadas no presentan síntomas o solamente algunas líneas blancas foliares durante un largo período, llamado fase de latencia, la cual prevalece en la mayoría de los cultivares comerciales que presentan tolerancia a la enfermedad, por lo que conviven con el patógeno durante varios años sin manifestar síntomas externos. Tokeshi (1997), considera que se desconocen las razones por las cuales se rompe el estado de latencia. Por lo general, se asume que el estrés climático o nutricional puede favorecer el desarrollo de la enfermedad.

La latencia prolongada conduce al establecimiento local de la enfermedad y constituye un peligro potencial para el proceso de cuarentena, así como durante la producción de semilla (Ricaud y Ryan, 1989).

Eclipse. Esta fase está íntimamente relacionada con la fase de latencia, pues también se presenta en cultivares resistentes y tolerantes, por lo cual representa un peligro potencial para la propagación de la enfermedad de forma inadvertida. Se caracteriza por la presencia de rayas blancas foliares que desaparecen al poco tiempo, sin que se observe ningún síntoma posterior. Una misma planta puede ser registrada como enferma o sana, en dependencia del momento en que se realice la inspección de la enfermedad en la plantación (Matos, 2002).

2.4 Histopatología

La histopatología de la escaldadura foliar, especialmente la naturaleza del rayado y otras clorosis, ha sido estudiada por varios autores (Birch, 1983; Birch y Patil, 1985). La bacteria se restringe a los vasos del xilema, en las áreas que muestran la línea fina de color blanco. No se ha encontrado en el parénquima adyacente clorótico de los vasos invadidos o en tejidos que muestran clorosis extensiva.

Las rayas finas de color blanco y la clorosis se desarrollan en las hojas antes de emerger. Este desorden se debe a la presencia de una toxina metabólica producida por el patógeno que actúa sobre los plastidios antes de la síntesis de clorofila por la planta. También sugirió que la zona de clorosis difusa alrededor de la línea blanca fina se derivó de una lenta desorganización de los plastidios y una consecuente destrucción de la clorofila (Ricaud y Ryan, 1989).

Birch y Patil, (1985) evaluaron los síntomas usando microscopía electrónica; encontraron que los cloroplastos estaban ausentes en el tejido clorótico pero existían proplastidios y etioblastos. Por otra parte, también prueban la presencia de una fitotoxina llamada albicidina, que ha sido identificada como una familia de

fitotoxinas y antibióticos que juegan un importante papel en la patogénesis de la escaldadura foliar de la caña de azúcar (Zhang *et al.* 1998).

Se ha demostrado que existe una fuerte correlación entre la producción de albicidina y la habilidad de causar clorosis (Birch y Patil, 1985; Zhang *et al.* 1999). Los estudios realizados sobre el modo de acción de esta toxina muestran que el blanco primario es la replicación del ADN.

2.5 Transmisión y hospedantes

Debido a la presencia de la bacteria en tallos asintomáticos, varios autores coinciden en señalar que esta condición contribuye a la diseminación de la bacteria, fundamentalmente, por los implementos de corte y por el empleo de semilla infectada (James, 2005; Garcés y Valladares, 2006; Chinea y Milanés, 2008). De acuerdo con Victoria *et al.* (1995), la bacteria puede permanecer viva sobre el machete infectado un promedio de seis días.

Se ha informado que existen otras vías de propagación del patógeno, entre ellas: el agua de lluvia o el suelo, exudados radicales por contactos entre plantas afectadas, daños mecánicos por el viento u otras causas, así como por algunos insectos y roedores (Daugrois *et al.* 2000), aunque la bacteria, al parecer, es incapaz de sobrevivir en el suelo por largos períodos (Rivera *et al.* 1979).

Daugrois *et al.* 2006, informaron la dispersión de la escaldadura en Guadalupe, a partir de gotas de agua con altas poblaciones bacterianas en el follaje. Se relacionó con zonas de alta humedad y lluvias, combinadas con el viento, lo cual propició un medio fundamental para la propagación de la enfermedad.

La caña de azúcar se considera el principal hospedante natural de *X. albilineans*, sin embargo, se han detectado también los síntomas de la enfermedad en algunas monocotiledóneas, como *Zea maíz* L., *Briachiaría piligera* (F. Muell), *Rottboellia cochinchinensis* (Lour.) W. Clayton, *Panicum máximum* Jacq; *Paspalum sp.*, *Pennisetum purpureum* Schumach (Rott y Davis, 2000).

2.6 Influencia de las condiciones ambientales

En observaciones sobre la propagación de la escaldadura realizadas en Islas Mauricio (Ricaud, 1975) y en Australia (Persley y Ryan, 1976; Ricaud y Ryan, 1989) confirmaron que esta enfermedad es favorecida por períodos húmedos, especialmente temporadas ciclónicas.

Pérez *et al.*(2002) estudiaron las condiciones que propiciaron los brotes encontrados en las colecciones de germoplasma de Jovellanos (Matanzas) y Florida (Camagüey), a finales de 1997 y principios de 1998, y observaron que la humedad relativa, precipitaciones y temperatura, a finales de la década del 90, contribuyeron a un marcado deterioro del clima en estas provincias, mientras que en Guaro (Holguín), donde también existe una colección de Germoplasma con los mismos genotipos, estas variables climáticas resultaron más estables y no se presentaron los síntomas.

2.7 Variabilidad de *Xanthomonas albilineans*

Diversos autores han aislado colonias de diferentes tamaños y formas celulares en cultivos de *X. albilineans*. En este sentido Ricaud y Ryan, (1989), plantean que las cepas bacterianas de crecimiento lento y que forman colonias más pequeñas tienen una alta proporción de células filamentosas alargadas y resultan los aislamientos más agresivos. No obstante Díaz (2000) refleja que no se ha comprobado relación entre la morfología de las células bacterianas y la sintomatología de los cultivares.

En investigaciones realizadas a finales de la última década del pasado siglo (Rott *et al.*, 1995; Rott y Davis, 2000), informaron la existencia de tres “serotipos” o “serovares” del organismo causal, ampliamente distribuidos en diferentes regiones geográficas del mundo cañero, según se puede observar a continuación:

Serovar I: Originario de varias áreas geográficas, actualmente informado en Argentina, Australia, Barbados, Belice, Brasil, Estados Unidos de Norteamérica,

Guadalupe, India, Martinica, Islas Mauricio, Madagascar, Papúa, Nueva Guinea, Islas Reunión, San Cristóbal, Santa Lucía y Taiwán. Díaz(2000) y Matos *et al.*(2003) informaron de la presencia de este serovar en Cuba.

Serovar II: Originario del África Tropical, reportado en Burkina Faso, Camerún, Costa de Marfil, Kenia, Reunión, Zaire y Zimbabwe.

Serovar III: Se informa su origen en las Indias Occidentales; presente actualmente en Brasil, Cuba, Fiji, Guadalupe, Indonesia, Martinica y Sri Lanka.

Según China y Milanés (2008), la variabilidad de las propiedades serológicas del organismo causal guarda cierta relación con las causas del surgimiento de brotes esporádicos de escaldadura que se han registrado en áreas cañeras de varios países:

Florida, EUA	1992
México	1993
Guatemala	1995
Louisiana, EUA	1995
Mauricio	1995
Texas, EUA	1995
Cuba	1998

Es muy importante tener en cuenta que las cepas pertenecientes al serovar I tienen la propiedad de propagarse por las corrientes de aire (Daugrois *et al.* 2003^b), lo cual constituye una peligrosa vía de contaminación para las áreas de semilla y las plantaciones nuevas que hayan sido plantadas con semilla categorizada.

2.8 Susceptibilidad de los cultivares

Los resultados alcanzados en los estudios realizados por décadas sobre la escaldadura foliar, sugieren que el grado de susceptibilidad de los cultivares y la proporción de genotipos susceptibles en una región determinada, son factores

importantes que determinan el nivel de incidencia y severidad, y como regla general, se han producido daños severos siempre que se han plantado extensas áreas con un cultivar altamente susceptible (Martin y Robinson, 1961; Ricaud y Ryan, 1989), mientras que una disminución de la enfermedad en Australia y Guadalupe se relacionó con un incremento en el porcentaje de cultivares resistentes (Rott *et al.* 1995).

Debido a que el establecimiento de la escaldadura foliar es lento, se requiere cierto tiempo para que la infección se establezca sobre un cultivar susceptible en una localidad donde el patógeno se ha mantenido bajo control.

En los casos donde se presenta infección latente, la acumulación del inóculo es imperceptible durante un tiempo, hasta que un cambio brusco de los factores ambientales origina condiciones favorables para que se produzca un brote “epifítico”, que generalmente sorprende a los productores y les causa una considerable disminución del rendimiento de campo y la calidad de la caña que envían al ingenio, lo que se traduce en pérdidas económicas irreversibles.

El primer estudio realizado en la Estación Provincial de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Jovellanos con 20 cultivares (Matos, 2002), reveló un comportamiento diferencial entre los cultivares estudiados; se observó en los genotipos L55-5 y C85-102, un comportamiento típicamente susceptible. Este resultado, entonces, centró la atención en el último cultivar por tratarse de un genotipo con amplias perspectivas de desarrollo. Los cultivares restantes C294-70, C439-72, C120-78, C91-301 y C266-70, alcanzaron categorías desde moderadamente susceptible hasta susceptible.

2.9 Control

Muchos autores coinciden en señalar como el método más eficiente, económico y seguro para el control de la enfermedad, es el empleo de cultivares resistentes (Huerta *et al.*, 2003; Garcés y Valladares, 2006; Chinea y Milanés, 2008). Sin embargo, otros insisten en aplicar medidas que contribuyan a evitar que se

desate una epifitía hasta tanto se cuente con suficientes cultivares comerciales (Carvajal *et al.*, 2007 y González *et al.*, 2008).

Diferentes autores han informado una aparente ruptura de la resistencia de algunos cultivares, muchos de ellos extendidos comercialmente, lo cual ha causado severas afectaciones a la producción de algunas áreas en Florida, Guadalupe, República Dominicana, México, Louisiana e Islas Mauricio (Davis *et al.*, 1994; Saumtally *et al.*, 1995 y Rott *et al.*, 1997). De Sousa y Silva, (2005), refieren que la ruptura de la resistencia está relacionada con la variabilidad del patógeno, lo que en ocasiones resta eficiencia y confiabilidad al control mediante cultivares resistentes y señalan que en Brasil se han presentado evidencias claras al plantear que cultivares catalogados como resistentes en algunas zonas, han resultado susceptibles en otras, provocando afectaciones a los productores cañeros.

Entre los procedimientos empleados para sanear los propágulos infectados de forma sistémica, se encuentran los tratamientos físicos y químicos a la semilla agámica y los métodos biotecnológicos, aunque la efectividad de estas técnicas no ha sido muy alta para la eliminación de la bacteria *X. albilineans*. (Saumtally *et al.*, 1995; Peralta *et al.*, 1997).

En Cuba, se aplica el método físico conocido como hidrotermoterapia, el cual consiste en sumergir los propágulos en agua caliente durante algún tiempo. La combinación más empleada y efectiva es la de 50,5⁰C durante 2 horas (Pérez, 2002), el cual ha mostrado buenos resultados para el control del raquitismo de los retoños y el carbón. Pérez *et al.* (2000) demostraron que un remojo previo de 36 horas con cambios de agua cada 12 horas y posteriormente aplicar una temperatura de 51⁰C durante 1 hora, podría ser empleada con efectividad para el saneamiento de la semilla agámica.

Otros autores proponen como método para erradicar los focos de la enfermedad, la inducción de la muerte de las plantas enfermas aplicando sobre éstas un asperjado del herbicida Glifosato (Aday *et al.*, 2001; Aday *et al.*, 2003).

El empleo del cultivo de tejidos para obtener plantas libres de microorganismos, constituyó una nueva posibilidad para la propagación de plantas sanas, lo cual contribuye con la mejora del material a propagar en áreas comerciales (García y Noa, 1998). El éxito de estos métodos se sustenta sobre la base de obtener, en cortos períodos, grandes volúmenes de vitroplantas con alta calidad genética y fitosanitaria. Entre las técnicas más empleadas se encuentran: el cultivo de ápices meristemáticos, termoterapia y electroterapia (Matos, 2002).

2.9.1 Cultivo de ápices meristemáticos

Se fundamenta en la distribución no uniforme de los microorganismos en las plantas infectadas y la disminución progresiva de su concentración hacia el ápice del tallo. Consiste en aislar asépticamente la región meristemática con 1-3 de los primordios foliares más jóvenes e implantarla en un medio de cultivo estéril con el propósito de inducir la diferenciación de células y tejidos en plántulas completas.

2.9.2 Termoterapia

Consiste en la exposición de plantas infectadas, tanto completas, como órganos o fragmentos de ellos, a tratamientos con altas temperaturas (30-52°C) o bajas temperaturas (4°C), durante determinados períodos de tiempo. El principio básico de los tratamientos radica en la posibilidad de eliminar o inactivar los microorganismos patógenos, en intervalos de temperatura y tiempos de forma tal que solo afecten ligeramente el tejido vegetal.

2.9.3 La combinación de termoterapia con el cultivo de meristemas

Se fundamenta en la atenuación del patógeno en plantas sometidas a tratamientos térmicos, permitiendo la escisión de meristemas de mayor tamaño con posibilidades de estar libres de microorganismos (Hernández, *et al.*, 1995).

2.9.4 Electroterapia

Consiste en la aplicación de corriente eléctrica a tejidos vegetales de forma tal que este no sufra afectaciones y elimine las infecciones virales y bacterianas fundamentalmente.

Aunque en Cuba existen experiencias en el saneamiento de varias enfermedades, en el caso de la escaldadura no hay experimentos dirigidos a conocer el porcentaje de saneamiento. Sin embargo, el uso de los métodos biotecnológicos en el Programa de Obtención de Semilla Básica por micropropagación acelerada, han permitido el 55% de vitroplantas libres de *Xanthomonas albilineans* lo que no se corresponde con el saneamiento al no conocerse si los donantes se encontraban o no infectados.

2.10 Diagnóstico e identificación de la escaldadura foliar de la caña de azúcar

Se han informado diferentes métodos para el diagnóstico de esta enfermedad que van desde la observación de los síntomas en el campo hasta las técnicas moleculares para la identificación del patógeno.

2.10.1 Observación visual de los síntomas.

Es comúnmente empleado, debido a que los síntomas de la enfermedad son típicos en cada una de las fases descritas; sin embargo, no es útil en el caso de infecciones latentes, debido a la carencia de síntomas visibles.

2.10.2 Aislamiento en medio de cultivo.

El aislamiento *in vitro* de *X. albilineans* en medios de cultivo bacteriológicos ha tenido limitaciones prácticas debido a la naturaleza fastidiosa del patógeno, su

lento crecimiento y exigencias nutricionales, así como por la baja eficiencia de las metodologías de aislamiento utilizadas (Davis *et al.* 1994). Es por ello que en la literatura internacional aparecen diferentes métodos a partir de exudados de la bacteria y macerados de tejidos (Ricaud y Ryan, 1989), siendo el más reciente el propuesto por (Davis *et al.* 1994), a partir del jugo del tallo colectado por centrifugación, diluido posteriormente en solución fosfato. Se ha utilizado ampliamente por diferentes autores debido a la selectividad del medio de cultivo conjuntamente con la consiguiente comprobación serológica de las colonias obtenidas.

Se ha demostrado que los contaminantes presentes en el jugo de caña pueden ser eliminados por diluciones del mismo, permitiendo el aislamiento de la bacteria en el medio basal de Wilbrink sin el uso del medio selectivo, especialmente cuando es alta la población del patógeno, con un índice de concordancia de 93.5% entre ambos medios.

Estudios recientes de comparación de diferentes alternativas de ambos tipos de medios, demostró que cuando las poblaciones del patógeno y los contaminantes eran bajas, el medio selectivo inhibía el crecimiento de la bacteria y no permitía su detección, fundamentalmente a partir de plantas asintomáticas, resultando en este caso más útil el medio Wilbrink (Caffer *et al.* 1998).

2.10.3 Diagnóstico serológico

Las técnicas serológicas han sido ampliamente utilizadas para el diagnóstico de fitobacterias (Comstock e Irey, 1992), incluyendo el género *Xanthomonas* (Benedict *et al.*, 1989).

Para el diagnóstico serológico de *X. albilineans* han sido evaluadas diferentes técnicas, entre ellas la microaglutinación y la inmunodifusión doble en agar (IDD) (Ricaud y Ryan, 1989), la inmunofluorescencia directa (IFD) e indirecta (IFI) (Guzman *et al.* 1997), el ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay);

(Comstock e Irely, 1992), la aglutinación en látex (Peralta, comunicación personal) y el TBIA (Tissue blot enzyme immunoassay) (Davis *et al.*, 1994), utilizando antisueros y anticuerpos monoclonales para esta especie (Tsai *et al.*, 1990).

Los límites de detección informados para los ensayos inmunoquímicos con esta bacteria varían de acuerdo a la técnica y los resultados de diferentes autores (Autrey *et al.*, 1997; Peralta *et al.*, 1997) y se enmarcan entre 10 y 1×10^5 1 x 10⁵ cél/ml.

La técnica UMELISA-DAS ha sido utilizada en el diagnóstico de la escaldadura foliar como parte del Programa de Obtención de Semilla Básica por Micropropagación Acelerada en caña de azúcar en Cuba (Peralta *et al.*, 1997), logrando la detección de 10^4 - 10^5 cél/ml (Matos *et al.*, 2001). El UMELISA-DAS es una modificación de la técnica ELISA Sandwich basada en la tecnología cubana conocida como sistema ultramicroanalítico (SUMA). La principal ventaja del método consiste en una reducción significativa de los costos por determinación, por la disminución del volumen de reacción desde 200-100 μ l hasta 10 μ l. Este método se utiliza para discriminar entre material vegetal sano y enfermo. En caña de azúcar, el UMELISA-DAS se ha aplicado en el diagnóstico a escaldadura foliar (*Xanthomonas albilineans*), gomosis (*Xanthomonas campestris* p.v *vasculorum*), raya roja (*Pseudomonas rubilineans*) así como para los virus baciliforme (VBCA) y el mosaico (VMCA).

2.10.4 Diagnóstico molecular

El uso de la PCR como herramienta de diagnóstico de bacterias fitopatógenas se ha incrementado dada su rapidez, sensibilidad y especificidad (Louws *et al.*, 1999). En el género *Xanthomonas* ha sido utilizada para la detección de *X. axonopodis* pv. *citri* (Hartung *et al.*, 1996) y *X. campestris* pv. *phaseoli* (Audy *et al.*, 1996). Para *X. albilineans* su uso es relativamente reciente (Pan *et al.*, 1997, 1999; Davis *et al.*, 1995, 1998; Wang *et al.*, 1999, Díaz, 2000).

Se han diseñado numerosos iniciadores para la PCR en la detección de *X.albilineans*; sin embargo, no todos han resultado específicos para la especie. Díaz(2000) desarrolló la n-PCR para el diagnóstico de *Xanthomonas albilineans*, utilizando iniciadores que permiten la amplificación de fragmentos de 48 Kb correspondientes a genes que codifican la síntesis de la albicidina, lo que resulta altamente específico para la detección de *Xanthomonas albilineans* (Rott *et al.*, 1996; Davis *et al.*, 1998).

La mayor ventaja de la n-PCR sobre la PCR clásica y la serología está dada por la gran sensibilidad de la técnica, aspecto de gran importancia en la reducción de los falsos negativos que afectan la sensibilidad diagnóstica. Además de altamente específica para *X. albilineans*, la n-PCR referida resultó más sensible para el diagnóstico del patógeno que la BIO-PCR (amplificación biológica inicial por cultivo *in vitro* seguida de la PCR) descrita anteriormente (Pan *et al.* 1997). Su utilidad se enmarca fundamentalmente en el análisis de donantes de los procesos de micropropagación y la evaluación de variedades de interés sometidas a cuarentena post-entrada, debido a la alta especificidad de los iniciadores utilizados y la sensibilidad diagnóstica y analítica demostradas (Díaz, 2000).

Por otra parte, se ha recomendado el uso de aplicadores de algodón en la toma de las muestras y conservación de jugos de tallos para su análisis mediante n-PCR, sin afectar el diagnóstico de la enfermedad (Díaz, 2000).

2.11 Influencia de la enfermedad en los rendimientos agrícola y azucarero

Los efectos económicos de la escaldadura foliar en la producción dependen del nivel de susceptibilidad del cultivar afectado, de las condiciones ambientales existentes en la zona y de la virulencia del organismo causal (Chinea *et al.* 2000). Cuando la enfermedad se presenta de forma aguda, puede ocurrir la muerte súbita de las plantas y destruir en pocos meses un campo plantado con cultivares susceptibles (Chávez, 2000).

En Ecuador se han registrado disminuciones en las toneladas de caña hasta el 34% (Garcés y Valladares, 2006). Chávez (2000), en México, informa la muerte del 10% de la población de tallos en cultivares susceptibles como Mex64-1487 y Mex80-1298. En Cuba, Pérez *et al.* (2004), encontraron afectaciones en C120-78 con más del 90% de los plantones con síntomas y el número de tallos secos o visiblemente afectados superaba 25%. Estos autores comprobaron que cuando la molida diaria del ingenio con este cultivar superaba el 10%, se producían pérdidas industriales entre 0,5-1% del rendimiento.

En México, (Huerta *et al.* 2000) informaron disminución del rendimiento en cultivares susceptibles en el rango de los 12,0 a 14,5 ton por ha⁻¹ con respecto al testigo y en variedades resistentes de 0 a 7,5 ton por ha⁻¹, coincidiendo con Rott *et al.* 1995, quienes consideraron reducciones de 14,2 a 17,2 ton por ha⁻¹ en variedades susceptibles; de 10,3 a 12,4 ton por ha⁻¹ en cultivares tolerantes y menores de 8,6 ton.ha⁻¹ en cultivares resistentes.

El rendimiento agrícola y la calidad de los jugos se deteriora, además, por reducciones del brix, la sacarosa y la pureza; efectos que se correlacionan estrechamente con el nivel de infección (Ovalle *et al.* 2007).

En Ecuador, Garcés y Valladares, (2006) encontraron una disminución del 28% de la sacarosa en el cultivar Mex64-1487, mientras que Pérez *et al.* (2003) informaron diferencias significativas en el brix, Pol y pureza, así como formación de dextrana. Resultados similares se han reportado por (Pérez *et al.*, 2002 y Barroso, 2008) en Cuba.

2.12 Situación de la escaldadura foliar en Cuba

En Cuba fue reportada por primera vez por Rivera *et al.*(1979) sin provocar daños de marcada importancia a la producción, sin embargo, no es hasta finales de 1997 y principios de 1998 que reaparece encontrándose en las provincias de Pinar del Río, La Habana, Matanzas, Villa Clara, Ciego de Ávila, Camagüey y

Las Tunas. Posteriormente aparece en Santiago de Cuba en la variedad C87-51 (Pérez, 2003). En la actualidad se ha reportado en todas las provincias del país.

Trabajos para diagnosticar la presencia de la bacteria arrojaron diferencias serológicas de *X. albilineans* (Díaz, 2000). De los 3 serovares encontrados en el mundo se ratificó la presencia de los serovares (I y III), encontrándose la mayor prevalencia del serovar I como causante de los brotes de 1997 y 1998 (Matos, 2002). Estos resultados coinciden con reportes de Rott *et al.*(1994) quienes plantean que el serovar I (Mascarena) es el más representado en la mayoría de los aislamientos circulantes en la actualidad y se ha identificado en Australia, Estados Unidos, India, Mauricio, Brasil, África del Sur y Guadalupe.

Según resultados de Pérez *et al.* (2000) en un estudio realizado a las colecciones de Germoplasma de Matanzas, Camagüey y Holguín se observó que las mayores afectaciones por la enfermedad se encontraron en la colección de Matanzas, donde el 18,6 % de los individuos mostró síntomas de la enfermedad. En Camagüey sólo mostraron síntomas el 0,3 % los individuos mientras que en Holguín no se reportó afectaciones.

Algunos factores como las condiciones fisiológicas con una plantación en cuarto retoño y el antecedente del huracán Lily a finales de 1996 en Matanzas, se asocian al comportamiento observado. También se encontró que las temperaturas, humedad relativa y precipitaciones presentaron diferencia con respecto a las medias registradas durante el período 1990-1996 entre Matanzas y Camagüey, no siendo así en la provincia de Holguín.

Al analizar los progenitores de las variedades más afectadas se destacaron fundamentalmente CP52-43, Ja60-5, Ja64-19, CP44-155. El análisis genealógico del material donador de susceptibilidad, conllevó a que la gran mayoría de estos progenitores provienen de los trabajos iniciados en Java y la India, donde se obtuvieron la serie de variedades POJ encabezadas por POJ2878 y de variedades de Coimbatore como Co205, Co281, Co356, Co453, entre otras (Pérez *et al.* 2001).

En áreas comerciales las variedades más afectadas por los primeros brotes fueron L55-5 y C120-78 según Pérez *et al.* (2004) y posteriormente en años más recientes han mostrado daños de consideración C86-503 y SP70-1284, todos estos daños en las provincias Occidentales y Centrales del país. Sin embargo, en diciembre de 2007, según MINAZ-INICA (2008) C120-78 ocupaba el 8,1 % y C86-503 el 20,3 % del área plantada en la provincia de Holguín sin que estos genotipos presentaran daños por la enfermedad en ese territorio. Pérez *et al.* (2018), informa la presencia de la bacteria de forma asintomática en más de 90% del área muestreada.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseminación de *Xanthomonas albilineans* en áreas comerciales

3.1.1 Presencia de los síntomas de la escaldadura foliar en los campos muestreados

Para la selección de las provincias Mayabeque, Matanzas, Camagüey y Las Tunas para el estudio, se tuvo en cuenta los siguientes criterios:

1. Matanzas y Camagüey, provincias en las cuales se informó la presencia de los principales focos de la escaldadura foliar en Cuba. (Pérez *et al.* 2003).
2. Mayabeque y Las Tunas, se incluyeron a partir de los informes del Servicio Fitosanitario (SEFIT) para la caña de azúcar (INICA, 2013).

El muestreo se realizó en el área de abastecimiento de 4 Unidades Empresariales de Base (UEB), en las provincias mencionadas (Tabla 1).

Tabla 1. Ubicación, características de las áreas y cultivares evaluados por provincias.

Provincia	UEB	Unidad	Área (ha)	Cultivar	Reacción en pruebas
Mayabeque	Manuel Fajardo	UBPC Manuel Fajardo	6,25	C86-12	Int.
Matanzas	Jesús Rabí	UBPC Batey	14,96	C85-102	R
Camagüey	Argentina	CPA Abel Santamaría	8,72	C86-503	AS
Las Tunas	Antonio Guiteras	UPC Velazco	26,50	C86-503	AS

Legenda: R=Resistente Int. = Intermedia; S=Susceptible; AS=Altamente Susceptible

La selección de los cultivares se realizó sobre la base del comportamiento ante la enfermedad: C86-503, altamente susceptible; C86-12, Intermedia y C85-102, resistente.

La reacción frente a la escaldadura foliar de todos los cultivares involucrados en el estudio está basada según resultados de las pruebas de resistencia a *X. albilineans* realizadas en la EPICA de Jovellanos, las cuales se realizan todos los años durante los meses de septiembre-octubre para la inoculación artificial y la lectura de los síntomas entre marzo y abril del siguiente año (5-6 meses posterior a la inoculación); se toma esta fecha para realizar estos estudios debido a que con el comienzo del periodo lluvioso se exagera la producción de síntomas de la enfermedad según lo publicado por Pérez *et al.*(2003).

Aleatoriamente se tomaron en cada UEB tres campos de diferentes bloques cañeros, y se muestrearon por el método de sobre cerrado (noroeste, noreste, centro, suroeste y sureste del campo); (Figura 3). Se tomaron 5 tallos en cada punto (15 por campo). La edad de las plantas muestreadas fue de 10 meses aproximadamente, según lo establecido por el Servicio Fitosanitario para la Caña de Azúcar (SEFIT, INICA, 2013).

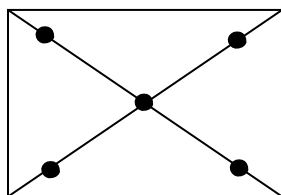


Figura 3. Esquema de muestreo en sobre cerrado.

3.1.2 Presencia de la escaldadura foliar en tallos asintomáticos en los campos muestreados

Se pesó 0.2 g del tejido vegetal la hoja +3de cada planta y se maceró en tampón de recubrimiento (1:5 p/v). Cada muestra se montó por triplicado. El diagnóstico

se realizó por el Sistema Ultramicroanalítico (SUMA). Se usó la variante UMELISA (Zardón *et al.* 2012) (Tabla 2), empleando el juego comercial “AGDIA” específico para *X. albilineans*. Se utilizaron los controles positivos y negativos suministrados por el fabricante (Firma AGDIA).

Tabla 2. Procedimiento de UMELISA-DAS según Zardón *et al.* 2012.

ETAPA	CONDICIONES
I. Sensibilización de la placa con muestras y controles positivos y negativos	10µL de la muestra Incubar 2 h y 30 min a 37°C
II. Adición anticuerpo específico anti X alb (AGDIA)	Dilución 1:1000 en PBS-leche descremada al 2,5%. Incubar en cámara húmeda 16h a 4°C
III. Adición del conjugado enzimático específico	Diluido 1:1500 en solución PBS leche descremada al 2.5 %. Incubar en cámara húmeda 3 h a 37°C
IV. Adición del sustrato fluorogénico	100µL de 4-metilumbeliferil fosfato en 900 µL de buffer dietanolamina. Incubar a temperatura ambiente y leer a los 10, 20 y 30 min

3.1.3. Relación de la infección de los campos con el rendimiento estimado y el número de cosechas.

Se comparó la relación existente entre el nivel de infección de los campos muestreados (propagación de la bacteria) con el rendimiento estimado de los

mismos según la base de datos de todas las UEB muestreadas en las cuatro provincias. Con este objetivo todos los campos se agruparon en tres grupos de acuerdo al rendimiento (<30 ton/ha; ÷30-60 ton/ha; >60 ton/ha).

Para el estudio de la relación entre el grado de infección de los campos con el rendimiento de los mismos se aplicó el test exacto de Fisher para tablas de contingencia y la regresión logística monovariada.

Para estudiar la relación entre el número de cosechas y nivel de infección, los campos se agruparon sin tener en cuenta el rendimiento, sino el número de cosechas que tenían cada uno de ellos y este se comparó con el porcentaje de tallos infectados, valor que se determinó por serología o presencia de síntomas, según protocolo establecido para el estudio de la diseminación.

3.2. Identificación y caracterización de aislamientos

3.2.1 Muestreo y aislamientos

Las plantas seleccionadas en los muestreos en cada provincia, se llevaron al laboratorio de Bacteriología de la Estación Provincial de Investigaciones de la Caña de Azúcar (EPICA) de Matanzas.

Se tomaron 4 aislados, uno por cada una de las provincias seleccionadas, a partir de los resultados obtenidos en el diagnóstico inicial.

Cada aislado se obtuvo de una muestra única formada por cinco hojas +3., las que se desinfectaron con alcohol al 70%, luego se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Se eliminó el exceso de humedad con papel de filtro. A partir de este procedimiento se trabajó en flujo laminar horizontal.

El tejido vegetal se cortó en segmentos pequeños (0,2g), se maceró ligeramente con agua destilada estéril y el extracto obtenido se colocó en tubos eppendorf de 1,5 mL. Posteriormente se hicieron diluciones seriadas hasta 1:1000 000 y se sembró en placas de Petri con medio de cultivo Wilbrink modificado y se suplementó con Cicloheximida (50mgL⁻¹), para evitar el crecimiento de bacterias

saprófitas según Rott *et al.* (1995). Las placas se incubaron durante 5 días a 28°C.

3.2.2 Caracterización morfológica

Para la caracterización morfológica se seleccionaron las colonias con características morfológicas típicas de *Xanthomonas albilineans* y se realizó la medición de la forma, tamaño, coloración y tipo de crecimiento de las colonias (Alves *et al.* 2011). Para la descripción de las características morfológicas de las colonias se tuvo en cuenta el tiempo de crecimiento, color y tamaño

3.2.3 Caracterización bioquímica

Los aislados obtenidos se sometieron a las siguientes pruebas bioquímicas: tinción de Gram, actividad catalasa, oxidasa y ureasa así con crecimiento en agar nutriente y en agar Kligler, producción de indol e hidrólisis de gelatina, esculina y almidón, fermentación de azúcares, descarboxilación de aminoácidos (lisina, ornitina, arginina) y utilización de citrato, glucosa y lactosa según Díaz, (2000).

3.2.4 Evaluación serológica

Se procedió según lo descrito en el epígrafe 3.2.1

3.2.5 Evaluación patogénica

Para la caracterización patogénica se seleccionaron los cultivares: C86-503, altamente susceptible; C85-102 resistente según Verdecia y La O (2012); C86-12, intermedio en las pruebas de inoculación artificial vigentes (Jorge *et al.* 2011).

Se plantaron propágulos de una yema tomados de un banco de semilla previamente diagnosticado por método serológico y libre de otras patologías.

Se inocularon 20 plantas de cada cultivar 30 días posteriores al brote, por el método de decapitación Koike (1980), con una suspensión bacteriana de 2×10^9 ufc.mL⁻¹ de cepas que presentaron las características culturales y morfológicas de *X. albilineans*, en dos variantes:

Aislado 1: Obtenido del cultivar C86-503, presentando los síntomas típicos de la escaldadura foliar.

Aislado 2: Obtenido del cultivar C85-102 resistente a la escaldadura foliar, según pruebas de resistencia, que no presentaba síntomas de la enfermedad al momento de realizar el muestreo.

Las plantas utilizadas como control, se inocularon con agua destilada estéril.

La presencia de síntomas característicos de la escaldadura foliar (líneas blancas y necrosis), se evaluó a partir de los 15 días con intervalos de 5 días, hasta 25 posteriores a la aparición de los primeros síntomas, y se realizó el conteo del número de hojas afectadas como porcentaje respecto al total de hojas evaluadas. Finalmente se procedió nuevamente al aislamiento de la bacteria, tal como se describió en el acápite 3.2.1 para verificar el cumplimiento de los postulados de Koch.

La comparación estadística de los dos tratamientos utilizados se basó en una prueba de contingencia, en la que se tuvo en cuenta el estadígrafo ji cuadrado (X^2). Las diferencias estadísticas fueron establecidas para $p \leq 0,05$.

3.2.6 Caracterización molecular

A partir de la bacteria aislada de una muestra positiva de cada una de las provincias del estudio, según diagnóstico serológico (SUMA), se realizó la extracción de los ácidos nucleicos totales del ADN mediante la técnica CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide), y el protocolo descrito por Racedo *et al.* (2015).

La concentración y calidad se estimó por la relación de la densidad óptica 260/280 en espectrofotómetro (Ultrospec Plus Spectrophotometer, Pharmacia LKB) y electroforesis en geles de agarosa 1% (Sambrook *et al.* 1989). Se utilizó el marcador de peso molecular 1000pb (Promega).

La PCR se realizó en un volumen total de 25 μl con 5 pmolL^{-1} de cada cebador (FGPS1490 y FGPS132), 200 mmolL^{-1} de dNTPs; 2,5 mmolL^{-1} de MgCl_2 ; 50 mmolL^{-1} de KCl; 10 mmolL^{-1} de Tris-HCl pH 9,0; 1% de Tritón X-100; 2,5 U de Taq polimerasa.

Las secuencias de los cebadores con los que se obtuvo un producto de 565pb (Nunes *et al.*, 2009), son las siguientes: FGPS1490: TGC GGC TGG ATC ACC TCC TT y FGPS132: CCG GGT TTC CCC ATT CGG y amplificaron una región espaciadora intergénica de las subunidades ribosomales 16-23S.

La amplificación se realizó en un termociclador programable (PTC100, MJ Research, USA), con el siguiente programa de reacción: desnaturalización un minuto a 94°C, 40 ciclos 30seg a 94°C, 30seg de alineamiento a 65°C, 1 minuto de extensión a 72°C y extensión final cinco minutos a 72°C.

Como control negativo en la PCR se usó agua destilada estéril. Se empleó como control positivo ADN del patógeno, procedente de aislamientos de plantas infectadas de forma natural, certificada con anterioridad en el Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA).

Los productos amplificados se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 1%, en un equipo horizontal (Biorad) a 100 volts durante 30 minutos. Luego se tiñeron con bromuro de etidio.

La visualización de las bandas puede hacerse directamente por tinción con bromuro de etidio (geles de agarosa) o nitrato de plata, a través de autoradiografía utilizando “iniciadores” marcados con radioisótopos en la reacción de PCR o mediante fluorescencia cuando se utilizan geles de secuenciación. La detección mediante fluorescencia es el método analítico con

mayor sensibilidad, mientras que la detección radioactiva y mediante tinción con AgNO_3 tienen sensibilidad equivalente (Creste *et al.* 2001).

Se realizó la secuenciación directa de los productos de la PCR a todas las muestras colectadas en cada localidad en un secuenciador automático (ABI PRISM® 377, Hitachi, Japón) con juegos de reactivos de secuenciación (Perkin-Elmer ABI-PRISM DyeTerminato Cycle Sequencing Kit).

Las secuencias de nucleótidos obtenidas en ambas direcciones se utilizaron para generar la secuencia consenso parcial del ARNr 16-23S, y posteriormente fueron analizadas con el programa BLASTN (Frishman *et al.* 2001) para reconfirmar la identidad de las muestras.

Los fragmentos amplificados purificados se analizaron en un secuenciador automático de ADN Abi (3130xl Genetic Analyzer, Hitachi), por el servicio del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Castelar, Argentina). Los resultados obtenidos de la secuenciación en ambos sentidos se usaron para generar la secuencia consenso con el uso del software DNA man (Lynnon BioSoft, Vaudreuil, Quebec, Canadá).

Las secuencias se compararon entre ellas y con otras depositadas en el Banco Internacional de Genes (**GenBank**) (Tabla 3). Su filogenia se determinó mediante ClustalX, y se consideró el vecino próximo como método de agrupamiento (Thompson *et al.* 1997), con un análisis de 1000 repeticiones al azar.

Tabla 3. Secuencias de aislados de *X. albilineans* empleadas en el análisis BLASTN.

<i>X. albilineans</i> Camagüey, Cuba.
<i>X. albilineans</i> GPE PC73 genoma completo, Francia(Pieretti <i>et al.</i> 2009)
<i>X. albilineans</i> cepa IBSBF 326 secuencia parcial del espaciador intergénico de las subunidades ribosomales 16S-23S y el gen de ARN ribosomal 23S, Brasil,(D'estefano <i>et al.</i> 2005)
<i>X. albilineans</i> cepa IBSBF 1374 16S-23S secuencia parcial del espaciador intergénico de las subunidades ribosomales 16S-23S y el gen de ARN ribosomal 23S, Brasil (D'estefano <i>et al.</i> 2005)
<i>X. albilineans</i> clon K0905 secuencia parcial del espaciador intergénico de las subunidades ribosomales 16S-23S y el gen de ARN ribosomal 23S, Estados Unidos(Schneider <i>et al.</i> 2010)
<i>X. albilineans</i> cepa CMP196 16S-23S secuencia complete del espaciador intergénico del ARN ribosomal, Estados Unidos (Pan <i>et al.</i> 1999)
<i>X. albilineans</i> secuencia parcial del espaciador intergénico y el gen del ARN ribosomal 23S, Brasil(Gonçalves y Rosato, 2002)
<i>X. albilineans</i> genes ARNt-Ala, espaciador intergénico y ARNt-Ile, Estados Unidos(Honeycutt <i>et al.</i> 1995)

Para comparar las secuencias se empleó el programa de alineamiento de secuencias de tipo local *Basic Local Alignment Search Tool* (**BLASTN**, Frishman *et al.* 2001). La homología se estableció a partir de la secuencia conservada de la región del ARNr 16-23S (Honeycutt *et al.*, 1995).

Para el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) se siguió el procedimiento de Bachem *et al.* 2000). Se seleccionaron dos aislados de *X. albilineans* procedentes de las localidades de Florida (Camagüey) y Jovellanos (Matanzas) caracterizados en el ensayo anterior; el ADN genómico de los mismos se digirió con las enzimas de restricción *Pst*I y *Mse*I, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Para la amplificación por PCR se utilizaron cuatro combinaciones de cebadores: A: P1-M1, B: P1-M2, C: P2-M1y D: P2-M2 (Tabla 4).

Tabla 4: Cebadores empleados en las reacciones AFLP.

Código	Cebador	Secuencia 5´-3´	Bases selectivas
P1	<i>Pst</i> I-1	GACTGCGTACATGCA	AA
P2	<i>Pst</i> I- 2	GACTGCGTACATGCA	AC
M1	<i>Mse</i> I-1	ATGAGTCCTGAGATAG	ACC
M2	<i>Mse</i> I-2	ATGAGTCCTGAGATAG	GGC

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Diseminación de *Xanthomonas albilineans* en áreas comerciales

4.1.1 Presencia de los síntomas de la escaldadura foliar en los campos muestreados

Los síntomas de la escaldadura foliar durante el diagnóstico visual realizado, se caracterizó por la presencia de rayas blancas o de color crema, a lo largo del limbo de la hoja. El ancho de las líneas fue variable y en ocasiones difusas, que se extendían hacia el borde de las hojas, provocando marchitez y necrosis foliar parcial o total. Alguno de los síntomas típicos de la enfermedad detectados en la provincia Camagüey se aprecia en la figura 4.

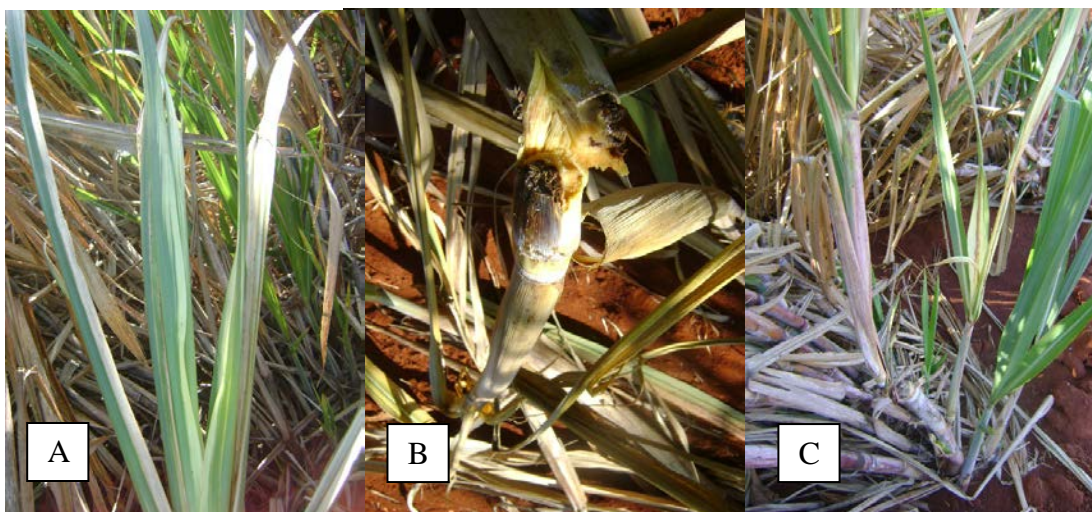


Figura 4. Síntomas y signos de escaldadura foliar observados en el cultivar C86-503 de la provincia de Camagüey A: raya fina blanca paralela a la nervadura central. B: coloración rojiza en los entrenudos y C: presencia de brotes laterales.

La provincia Camagüey presentó un mayor porcentaje de plantas con síntomas de la enfermedad para un nivel de infección del 21%, valor que mostró diferencias significativas ($p \leq 0,05$ según el test exacto de Fisher para tablas de contingencia y la regresión logística monovariada) con respecto a los obtenidos

en la provincia Las Tunas (10%). En Mayabeque y Matanzas no se observaron síntomas de la enfermedad en los campos muestreados (Figura 5).

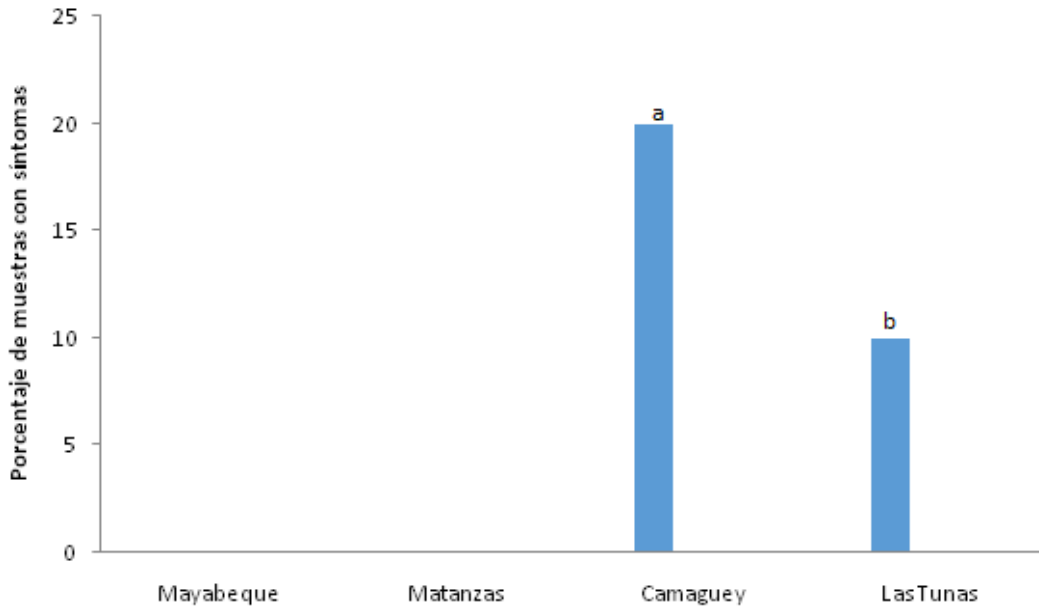


Figura 5. Nivel de infección con *X. albilineans* diagnosticada por la presencia de síntomas en el área muestreada. Letras desiguales difieren significativamente ($p \leq 0,05$).

Las diferencias en la presencia de síntomas de *Xanthomonas albilineans* obtenidos entre las provincias evaluadas, está relacionado con el nivel de tolerancia de los cultivares muestreados. Daugrois *et al.* (2014) evaluó poblaciones epifíticas de *X. albilineans* con la incidencia y severidad de los síntomas bajo presiones de inóculos naturales. Informó que la manifestación de la sintomatología de la escaldadura foliar varía dependiendo de la resistencia varietal.

4.1.2 Presencia de la escaldadura foliar en tallos asintomáticos en los campos muestreados

Para el diagnóstico serológico (SUMA) se evaluaron 180 tallos entre las cuatro provincias, 13 de ellos mostraron síntomas visibles de la enfermedad y 167 no mostraron sintomatología alguna. Al realizar el diagnóstico serológico por la

técnica DAS-UMELISA se confirmó la presencia de la bacteria *X. albilineans* en los tallos con síntomas y de los tallos asintomáticos evaluados el 44,3% revelaron la presencia de la bacteria.

Durante el periodo 1978 al 2000, se reportaron en Cuba dos focos de la escaldadura foliar de la caña de azúcar; el primero en variedades introducidas por la provincia de Camagüey (Rivera, 1979) y el segundo también en estos mismos territorios y con características epifíticas sobre el banco de germoplasma de la caña de azúcar en la provincia de Matanzas, asociados con la presencia de los serovares I y III (Díaz, 2000).

Entre los años 2004 y 2005, el servicio fitosanitario para la caña de azúcar (SEFIT) reportó, a partir de los síntomas de la enfermedad por debajo de 1,5 % del área encuestada, asumiendo esta como la propagación de la enfermedad en el país (Rodríguez *et al.* 2008) y más recientemente se reportó solo su presencia asintomática en el 0,01% del área encuestada (INICA, 2018).

La aplicación de las técnicas serológicas en el presente estudio demuestra que la bacteria puede permanecer de forma latente. Esto coincide con lo informado por Rott *et al.* (1997), quienes alertaron que la enfermedad puede permanecer en la fase de latencia durante largos períodos de tiempo.

Hasta la fecha la infección asintomática no se ha tenido en cuenta, por lo que los resultados de esta tesis demuestran la existencia del patógeno en Mayabeque, Matanzas, Camagüey y Las Tunas. Los resultados publicados por Pérez *et al.* (2016), revelaron la propagación de *X. albilineans*, así como lo importante de contar con métodos de diagnóstico inmunoquímico y/o molecular, al menos en áreas especializadas como bancos de semilla y áreas experimentales con el objetivo de minimizar la propagación de la enfermedad.

Varios autores han informado recientemente la detección de la bacteria en tallos asintomáticos. En México se informó la presencia de la enfermedad de forma

latente a través de la detección por la técnica inmunológica adsorción de gotas, en clones considerados como tolerantes, los cuales carecían de síntomas visuales (Salomón *et al.*, 2015).

Por otra parte, Ling-Hong *et al.* (2018) informaron la aparición de la enfermedad en las provincias Guangxi, Guangdong, Hainan y Fujian en China. El patógeno se detectó en el 73 y 17% de los tallos con síntomas y sin síntomas de la enfermedad respectivamente, empleando métodos moleculares. Duarte *et al.* (2018), informó la detección del patógeno en 70 tallos de plantas sin síntomas con el uso de métodos LAMP (A loop-mediated isothermal amplification), PCR y nested PCR.

4.1.3 Relación de la infección de los campos con el rendimiento estimado y el número de cosechas.

Los resultados de las evaluaciones realizadas en las provincias seleccionadas coinciden con los resultados anteriores. En Camagüey y Las Tunas se mostraron incrementos notables de los niveles de infección debido al empleo de cultivares susceptibles C86-503, el cual se considera altamente susceptible (AS), según los resultados de las pruebas de resistencia realizadas, (INICA, 2013), mientras que en las provincias Mayabeque y Matanzas, los cultivares C85-102 y C86-12 se informan como resistente (R) e Intermedio (Int), respectivamente.

A partir de los datos sobre el rendimiento proporcionados por las UEB evaluadas, se realizó una comparación entre el nivel de infección y el rendimiento estimado de los campos y se observaron diferencias significativas. Los campos con rendimientos de más de 60 t/ha mostraron menor porcentaje de plantas infectadas ($p < 0,05$), mientras que los campos con rendimientos menores al 60% mostraron afectación en los rendimientos estimados (Figura 6).

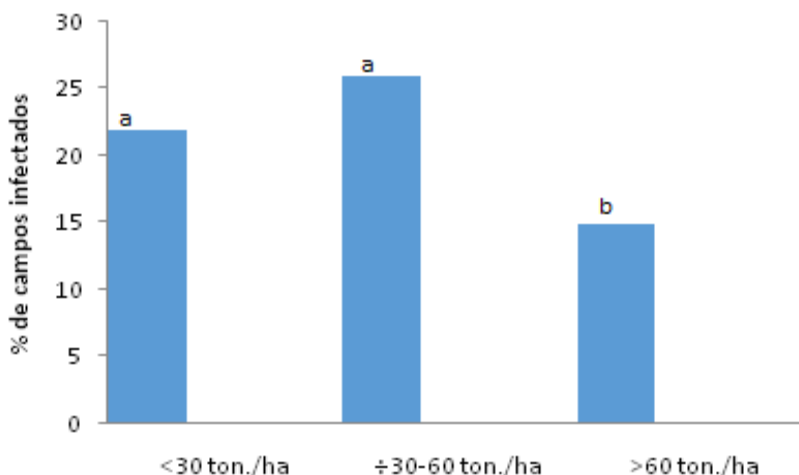


Figura 6. Nivel de infección por rendimiento estimado. ^{a, b}Letras desiguales difieren significativamente $p < 0,05$.

Estos resultados muestran la relación de la enfermedad y el rendimiento productivo del cultivo, tal como ha sido informado por otros autores (Rott *et al.*, 1997, Huerta *et al.*, 2003). Rott *et al.* (1995) encontraron que las diferencias en el rendimiento de las plantas controles y las inoculadas dependieron de los cultivares en cuestión, en algunos casos hubo una reducción significativa de los rendimientos, pues como se conoce, la escaldadura foliar es una enfermedad devastadora de este cultivo debido a que ocasiona la muerte del plantón, reducción del número de tallos molibles, y reducción del peso del tallo en cultivares susceptibles principalmente.

Pérez *et al.* (2016) determinó que la presencia de la bacteria *X. albilineans* en tallos asintomáticos afecta el contenido azucarero de los mismos, lo cual constituyó un aporte al conocimiento de la relación patógeno–hospedante para esta enfermedad. Los tallos se colonizan 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.

La Figura 7 muestra la relación entre el nivel de infección y el número de cosechas. En la cepa caña planta se observa un mayor porcentaje de tallos infectados que en la soca, mientras que a partir del primer retoño el porcentaje de tallos infectados aumenta.

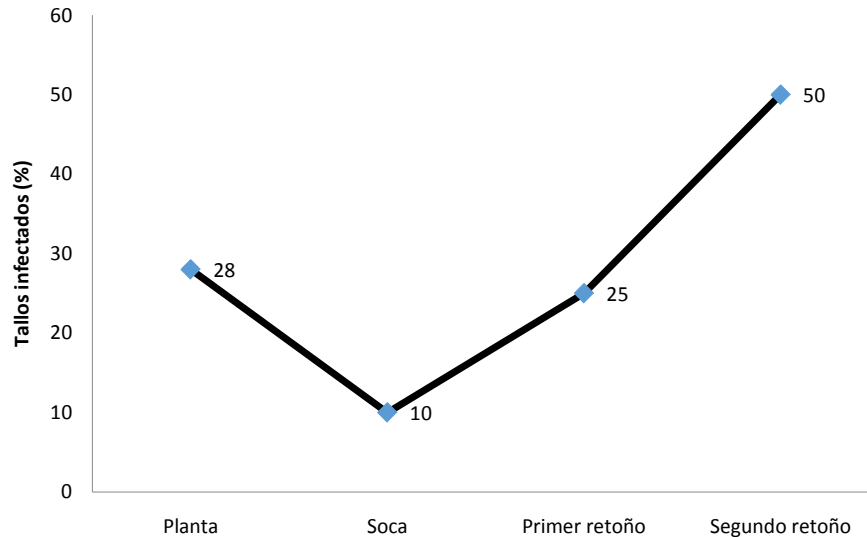


Figura 7. Nivel de infección de *Xanthomonas albilineans* en relación con el número de cosechas.

Rott *et al.* (1995) en un estudio en el que se evaluaron plantas infectadas hasta el tercer retoño encontraron que el porcentaje de tallos con síntomas de la enfermedad y la severidad disminuían en el tiempo. En otros estudios, al inocular *Xanthomonas albilineans* en caña planta y primer retoño Rott *et al.* (1997) encontraron que las plantas inoculadas parecen recuperarse cuando pasa de caña planta al primer retoño.

Según estos autores, este comportamiento no estuvo relacionado con la resistencia de los cultivares pues algunos altamente susceptibles no mostraron

síntomas severos y no se detectó la presencia de la bacteria en el primer retoño. No obstante, no se descartó la hipótesis que la bacteria no se haya detectado por el límite resolutivo de las técnicas empleadas, debido a su acumulación en otros tejidos no examinados u otros factores (Rott *et al.*1997).

La amplia distribución de la bacteria en áreas de producción exige extremar las medidas de saneamiento, con énfasis en la desinfección de los equipos de corte y tratamiento hidrotérmico de la semilla para evitar la diseminación de la enfermedad.

4.2. Identificación y caracterización de aislamientos

4.2.1. Muestreo y aislamientos

Como se describe en el epígrafe 3.2.1 de materiales y métodos se realizó el aislamiento de la bacteria de las muestras tomadas en las provincias en estudio.

4.2.2. Caracterización morfológica

A partir de las muestras tomadas de plantas con síntomas y asintomáticas sembradas en el medio de cultivo de peptona y sacarosa, se apreciaron colonias lisas amarillas y no mucoides, mientras en medio Wilbrink, manifestaron una consistencia gelatinosa y aspecto brillante, amarillas, circulares y de bordes uniformes; similares a las descritas por (Díaz, 2000; Matos, 2002 y Montan, 2009) (Figura 8).

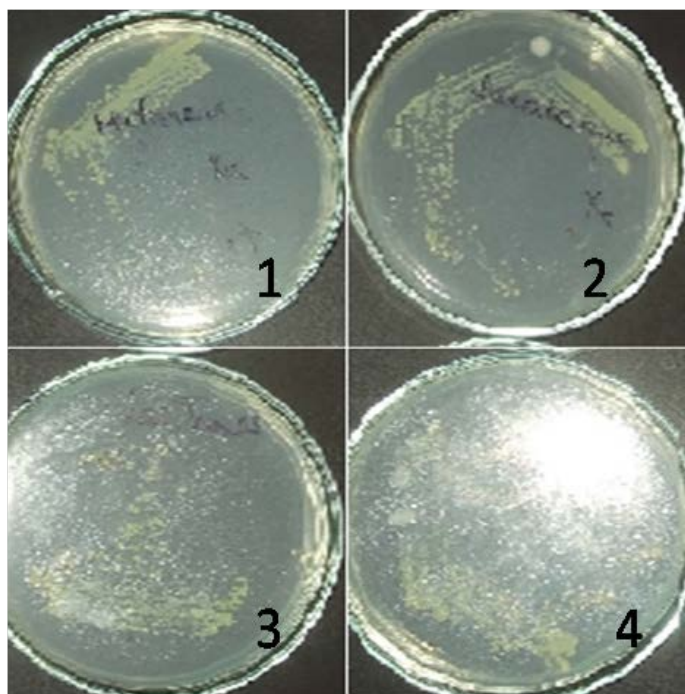


Figura 8. Crecimiento de *Xanthomonas albilineans* en medio selectivo Wilbrink.

Leyenda 1: Matanzas, 2: Mayabeque, 3: Camagüey, 4: Las Tunas

Con el empleo de la microscopia óptica se profundizó en su morfología: se visualizaron bacilos cortos, móviles a partir de un flagelo polar con dimensiones de entre 0,4-0,9 x 0,7-2,0 μm .

4.2.3 Caracterización bioquímica

De acuerdo con lo descrito en el epígrafe 3.2.3, la caracterización bioquímica se realizó a partir de cuatro aislados, uno por cada provincia en estudio. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Indicadores bioquímicos de aislados de *Xanthomonas albilineans* procedentes de cuatro provincias cubanas.

Pruebas	My.	Mat.	Cam.	LT
O/F	O	O	O	O
GRAM	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+
Ureasa	-	-	-	-
Oxidasa	-	-	-	-
Producción Indol	-	-	-	-
Hidrólisis de				
Gelatina	+	+	+	d
Esculina	+	+	+	+
Almidón	-	-	-	-
Crecimiento en				
AN	-	-	-	-
Agar Kligler	R/A	R/A	R/A	R/A
Fermentación y utilización de azúcares				
Lactosa	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-
Glucosa	+	+	+	+

Leyenda: Aislados de: Mayabeque (My); Matanzas (Mat); Camagüey (Cam.); Las Tunas (LT); AN, Agar Nutriente;; Oxidativo-fermentativo (O/F); Rojo/Alcalino (R/A); débil (d); reacción negativa (-); reacción positiva (+)

Las pruebas bioquímicas confirmaron la presencia de la especie *X. albilineans* que junto a los estudios morfológicos realizados no indican variabilidad entre los diferentes aislados evaluados, resultados que coinciden con estudios realizados en Cuba (Díaz 2000). Otros autores también han obtenido resultados similares trabajando con aislados de diferente procedencia (Alves *et al.*, 2011; Stand, 2011 y Alves *et al.*, 2016).

Los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a los aislamientos obtenidos permitieron identificarlos como *X. albilineans*, destacándose la

coincidencia de las propiedades bioquímicas entre todos ellos. Se confirma homogeneidad de las propiedades bioquímicas y fisiológicas de la especie y su clara delimitación dentro del género *Xanthomonas* (Yang *et al.*, 1993). No obstante, existen autores que informan cepas con características que difieren de los patrones establecidos para la especie, fundamentalmente con respecto a la producción de ácido a partir de arabinosa, fructosa, manosa y glucosa, así como la utilización de almidón y gelatina (Vauterin *et al.*, 1995; Autrey *et al.*, 1997).

En Cuba, cuando se caracterizaron los aislamientos de los focos de escaldadura ocurridos entre 1978-1982 (Rivera, 1985) y del brote en 1998 (Díaz, 2000), se observó variabilidad en la producción de ácido a partir de fructosa y la utilización de gelatina; en el resto de las pruebas bioquímicas se obtuvo una total coincidencia entre la población bacteriana estudiada. En este trabajo se obtuvo un comportamiento similar en los aislamientos respecto a las pruebas bioquímicas incluidas.

En la literatura internacional se ha señalado diferencias con respecto al tamaño de las colonias en cultivo y la morfología celular en esta especie, así como la existencia de células filamentosas (Ricaud y Ryan, 1989), que han sido asociadas a las colonias pequeñas o de lento crecimiento y a la agresividad de los aislamientos (Birch, 2001). Sin embargo, la información sobre la variabilidad morfológica de esta especie y su correlación con las variaciones serológicas, moleculares y patogénicas de los aislamientos es muy limitada.

4.2.4 Evaluación serológica

Mediante la prueba de diagnóstico serológico DAS-UMELISA fue detectada la presencia de la bacteria *X. albilineans* en plantas con y sin síntomas de los campos comerciales evaluados y en todos los cultivares. (Tabla 6)

Tabla 6. Resultados del diagnóstico de escaldadura foliar en cuatro provincias.

Provincia	Cultivar	Plantas muestreadas (cantidad)		UMELISA	
				Presencia de <i>Xa</i>	
		C/S	S/S	Positivas	Negativas
Mayabeque	C86-12	0	45	25	20
Matanzas	C85-102	0	45	16	29
Camagüey	C86-503	9	36	21	15
Las Tunas	C86-503	4	41	12	29
Total		13	167	74	93

Leyenda: C/S, plantas con síntomas; S/S, plantas sin síntomas

En Mayabeque y Matanzas, del total de plantas sin síntomas visuales, se detectó la presencia del patógeno en 25 y 16 respectivamente por UMELISA-DAS. Los resultados de este ensayo muestran que el 100% de las plantas con síntomas tenían presencia de la bacteria, mientras que en las asintomáticas esto ocurrió solo en el 44,3%.

El límite mínimo de detección por esta técnica serológica está entre 1.11×10^5 y 1.38×10^5 ufc/g de tejido fresco; en un campo plantado con el cultivar susceptible C86-503, los términos medios y los alcances de los rangos de distribución de la densidad de población del patógeno se estimaron estimados en 2.21×10^5 ufc ($\pm 7.82 \times 10^4$)/g de tejido fresco en plantas sintomáticas seropositivas y 2.80×10^5 ufc ($\pm 3.25 \times 10^5$)/g de tejido en plantas asintomáticas seropositivas. Duarte *et al.*, 2018 informó que generalmente en tallos con síntomas de la enfermedad se

asocian con altas poblaciones del patógeno (10^7 - 10^9 ufc/ml), mientras los tallos asintomáticos con bajas poblaciones (10^3 ufc/ml) o sin presencia de la bacteria.

4.2.5 Evaluación patogénica

Xanthomonas albilineans es una bacteria gram-negativa con flagelo polar que le permite moverse por un medio acuoso (Agrios, 1997), penetra en el tejido huésped (preferiblemente por las hojas) ya sea a través de una herida o aprovechando alguna apertura natural como las estomas, multiplicándose en los espacios intracelulares.

Para la evaluación de la patogenicidad se emplearon dos inóculos obtenidos a partir de *X. albilineans* obtenidas de plantas con síntomas de la variedad C86-503 (Aislado 1) y de plantas asintomáticas de la variedad C85-102 (Aislado 2), los que se inocularon en las variedades: C86-503, altamente susceptible; C86-12, intermedio y C85-102, resistente a la enfermedad.

Al inocular las plantas sanas con ambos cultivos, se logró la reproducción de los síntomas de escaldadura foliar (Figura 9).



Figura 9. Síntomas de escaldadura foliar en caña de azúcar (*Saccharum spp.*) cv. C86-503 inoculada con la bacteria *X. albilineans* A. Necrosis en vivero 20 días posterior a la inoculación en plántula de 60 días de edad; B y C, Rayas blancas y necrosis en campo, respectivamente, 30 días después de la inoculación en plantas de cuatro meses de edad.

Los síntomas obtenidos se caracterizan por la presencia de rayas blancas que forman un ángulo agudo con la nervadura central y áreas de tejido necrosado en el follaje, con variaciones en función de la tolerancia genética de los genotipos estudiados (Tabla 7)

El aislado 2 reprodujo los síntomas de la escaldadura foliar, constituyendo otra evidencia de que la bacteria se encuentra de forma asintomática y sin embargo tiene la capacidad de reproducir los síntomas.

Tabla 7. Porcentaje de plantas con síntomas en la prueba de patogenicidad.

Aisl.	Días	Rayas blancas (%)			Necrosis (%)		
		C86-503	C85-102	C86-12	C86-503	C85-102	C86-12
1	15	50	60	50	0	10	20
	20	40	60	70	10	20	10
	25	40	50	68	15	15	7
2	15	30	50	60	40	70	70
	20	0	10	20	20	20	20
	25	36	67	70	15	15	10
Control		0	0	0	0	0	0

Matos *et al.* (2017) comprobó la patogenicidad de aislados de *X. albilineans* en el cultivar susceptible L55-5 al reproducir la sintomatología de la escaldadura foliar en condiciones de vivero.

De acuerdo al porcentaje de plantas con síntomas de necrosis, se confirmó la patogenicidad de ambos aislados, con una evolución en el tiempo ligeramente superior para el Aislado 2, sin embargo, esa diferencia según la prueba ji cuadrado (X^2) no puede considerarse significativa, por lo que no se pudieron establecer diferencias patogénicas entre los dos aislados obtenidos a partir de muestras tomadas de diferentes cultivares y campos (Figura 10).

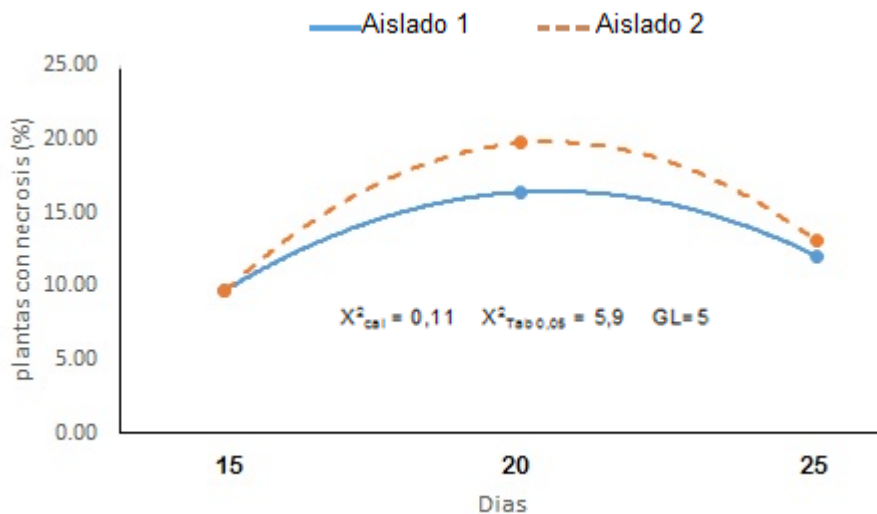


Figura 10. Evolución de los síntomas de escaldadura foliar en el tiempo

En todos los casos se reaisló la bacteria, y se confirmó mediante DAS UMELISA la presencia de la enfermedad. Al cumplirse los postulados de Koch se confirma una vez más que éstos pueden considerarse semejantes a la Demostración de Patogenicidad en enfermedades bacterianas sistémicas como la escaldadura foliar, lo que coincide con los criterios de Arauz (1998) y Taher-Kani (2010).

Resultados similares se informaron por Matos *et al.* (2017) y Zhang *et al.* (2017). Ambos demostraron los postulados de Koch al reaislar la bacteria después de la inoculación.

Algunos autores como Birch y Patil (1987) y Rott y Davis (2000) refieren que el síntoma de rayado de las hojas, puede deberse a que algunas veces aparece y posteriormente pasa a la fase de latencia o eclipse, situación que puede estar

condicionada por influencias climáticas o el nivel de resistencia del cultivar hospedante, mientras que la necrosis es un síntoma irreversible. Por estas razones se infiere que entre los aislados en estudio no existen diferencias patogénicas.

4.2.6 Caracterización molecular

La amplificación de los fragmentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los aislamientos representativos de las provincias Mayabeque, Matanzas, Camagüey y Las Tunas permitió visualizar una banda común en las muestras a la altura de 620pb, la cual se corresponde en intensidad y migración por la obtenida por el control positivo utilizado. La muestra que corresponde con el control negativo no originó señales de amplificación. (Figura 11).

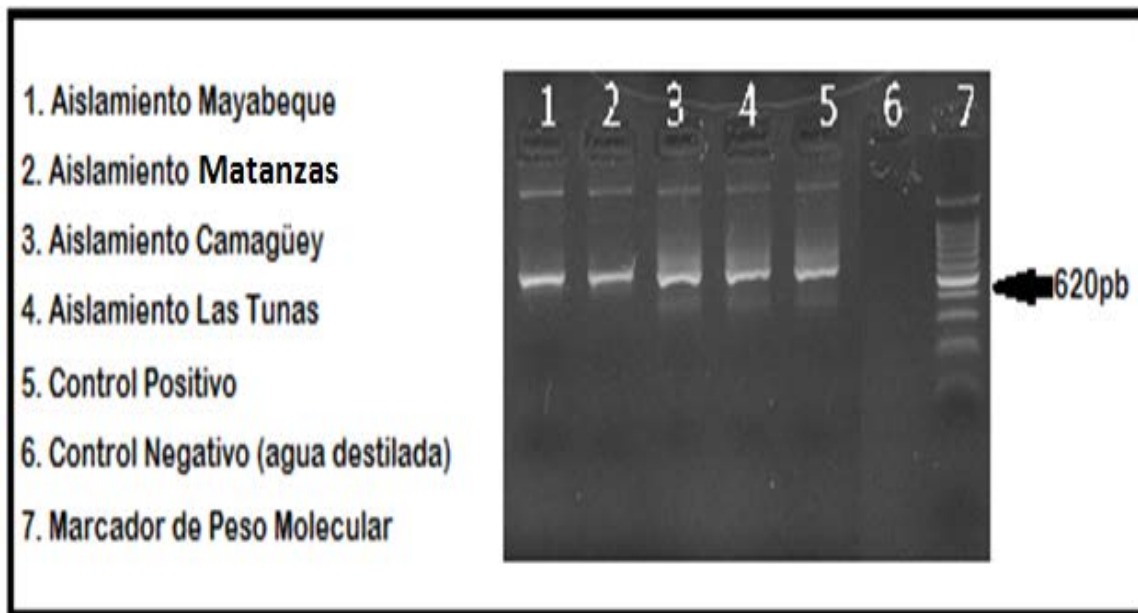


Figura 11. Productos de la amplificación en Gel de agarosa 1 %

Estos resultados sugieren la posibilidad que la cepa de *X. albilineans* detectada en plantas con síntomas de la enfermedad así como en plantas

asintomáticas en las provincias muestreadas, pertenecen a la misma cepa bacteriana.

En diversos trabajos se ha demostrado la existencia de características que distinguen a la especie *albilineans* del resto de las *Xanthomonas*; entre ellas, la ausencia de Hrp T3SS, que es un marcador universal de patogenicidad (Daugrois *et al.* 2012). Como se muestra en la figura 12 el análisis AFLP permitió comparar el genoma completo de un aislamiento de Jovellanos (Matanzas) y uno de Florida (Camagüey). Los patrones de bandas obtenidos con cada par de cebadores empleados fueron similares para las dos muestras analizadas

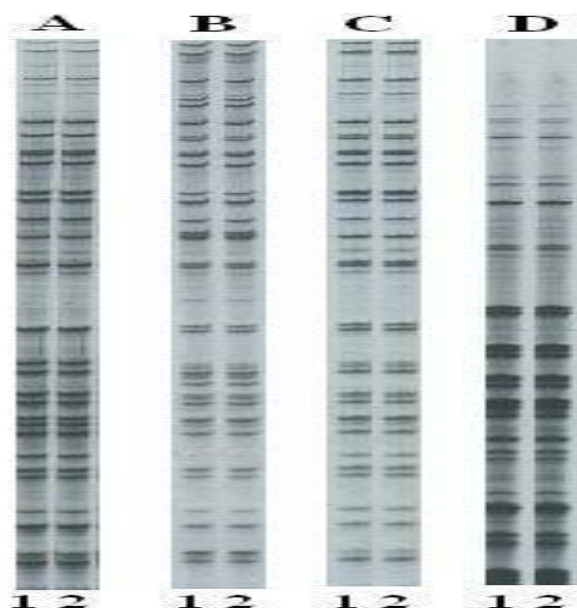


Figura 12. Patrón de bandas AFLP obtenido en gel de acrilamida 9% con las combinaciones de cebadores A: P1-M1, B: P1-M2, C: P2-M1 y D: P2-M2, de los aislamientos de *X. albilineans* 1 de Jovellanos y 2 de Florida.

Por otra parte, el perfil AFLP confirmó los resultados obtenidos al comparar las secuencias correspondientes al ADNr 16-23S de *X. albilineans*, demostrando que los aislamientos bacterianos procedentes de Jovellanos y Florida, están relacionados genética y epidemiológicamente. Esta podría ser una herramienta

útil para demostrar polimorfismo a nivel del genoma completo de esta bacteria (Pieretti *et al.*, 2012; Pieretti *et al.*, 2015; Ying *et al.*, 2016).

Hasta el momento, el único factor de patogenicidad asociado a esta bacteria, es la producción de la toxina albicidina; sin embargo, la secuenciación completa de su genoma puede proveer nuevos candidatos a factores de virulencia a través del monitoreo por mutagénesis de una librería de transposones (Rott *et al.*, 2011).

Champoiseau *et al.* (2006) en Guadalupe inocularon 75 cepas en el cultivar susceptible B69566 encontrando, en 19 de estas, variación en la patogenicidad observada sobre la base de la colonización del tallo. La producción *in vitro* de albicidina varió entre estas, pero el patrón de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción de sus genes de biosíntesis de albicidina fue idéntico. Del mismo modo, no se encontró variación genómica entre las cepas mediante electroforesis y sí una cierta variación por el polimorfismo de longitud de fragmento amplificado, y ninguna relación entre esta variación genética y la variación en la patogenicidad.

Durante la década del 90, la variabilidad en *X. albilineans* se basó en propiedades inmunológicas y se identificaron entonces las tres variantes serológicas antes relacionadas en diferentes aislamientos de una colección mundial del patógeno (Rott *et al.* 1994). Posteriormente, se ha informado variaciones genéticas y patogénicas, pero aún no se ha encontrado correlación entre los marcadores genéticos y de patogenicidad de la bacteria (Daugrois *et al.* 2012).

Mensi *et al.* (2013) realizaron estudios con aislados obtenidos de plantas de caña de azúcar con síntomas de escaldadura foliar procedentes de Gabón, y encontraron mayor agresividad que la observada en los aislados de Guadalupe y Florida. También en México, Huerta *et al.* (2009) amplificaron el segmento de ADN de cuatro cepas de *X. albilineans* obtenidas en Veracruz y

Chiapas, de las cuales dos, aunque presentaron 98% de homología con un aislado procedente de Brasil, resultaron más agresivas.

Salomón *et al.* (2015) informó el primer reporte de la presencia de *X. albilineans* en Tabasco, México, confirmado a nivel molecular por el análisis molecular mediante amplificación de un fragmento de 16S rADN (1392 pb) y mostró similitudes máximas con las secuencias de *X. albilineans* registradas en el Genbank.

Nuestros resultados coinciden de forma general con estos y otros autores los cuales han informado variaciones del patógeno pero aún no han encontrado correlación entre los marcadores genéticos y de patogenicidad de la bacteria (Daugrois *et al.*, 2012), tal vez por una erosión significativa del genoma de la bacteria que constituye un caso singular dentro de la *Xanthomonadas* (Pieretti *et al.*, 2015; Kretz *et al.*, 2015).

Por otra parte, los resultados expuestos en este trabajo indican que no se pudo establecer diferencias patogénicas entre los aislados obtenidos a partir de cultivares de caña de azúcar con y sin síntomas de la enfermedad. Díaz (2000) en Cuba, al estudiar la patogenicidad sobre maíz *Zea Mays* de 19 aislados obtenidos a partir de plantas de caña de azúcar con síntomas de la escaldadura foliar, tampoco encontró diferencias patogénicas entre estos.

La comparación de este aislado cubano con otras ocho cepas publicadas en el Banco Internacional de Genes (Tabla 7), demostró su marcada similitud con las mismas, con 100% de identidad y porcentaje de cobertura con un fragmento del genoma de la cepa GPE PC73 de Guadalupe, aunque con las cepas KO905 procedente de Estados Unidos y la de Brasil también tuvo 100% de identidad para un fragmento de menor tamaño.

Tabla 7. Comparación del segmento de ADN de la región intergénica del aislado cubano de *X. albilineans* con las secuencias de otras cepas publicadas en el Banco Internacional de Genes.

Aislamiento de <i>X. albilineans</i>	% de cobertura	Valor-e $\leq 1e^{-5}$	% Identidad Máxima
GPE PC73 genoma completo	100	0.0	100
Cepa IBSBF 326 secuencia parcial del espaciador intergénico de las subunidades ribosomales 16S-23S y el gen de ARN ribosomal 23S.	95	0.0	99
Cepa IBSBF 1374 16S-23S secuencia parcial del espaciador intergénico de las subunidades ribosomales 16S-23S y el gen de ARN ribosomal 23S.	94	0.0	99
Clon K0905 secuencia parcial del espaciador intergénico de las subunidades ribosomales 16S-23S y el gen de ARN ribosomal 23S.	85	0.0	100
Cepa CMP196 16S-23S secuencia complete del espaciador intergénico del ARN ribosomal.	78	0.0	99
Secuencia parcial del espaciador intergénico y el gen del ARN ribosomal 23S (Brasil)	57	0.0	100
Genes ARNt-Ala, espaciador intergénico y ARNt-Ile.	19	2,00E-54	97
Genes ARNt-Ala, espaciador intergénico y ARNt-Ile.	19	8,00E-53	96

Los resultados de este trabajo y su relación con la literatura internacional revisada permiten sustentar la hipótesis de la circulación generalizada de un aislamiento que puede encontrarse tanto en plantas con síntomas de la escaldadura foliar como en las asintomáticas.

5. CONCLUSIONES

1. *Xanthomonas albilineans* se detectó en las provincias de Mayabeque, Matanzas, Camagüey y Las Tunas en plantas con síntomas de la escaldadura foliar y en plantas asintomáticas en el 44,3% de las muestras analizadas.
2. Las colonias de *Xanthomonas albilineans* obtenidas a partir de plantas con síntomas de la escaldadura foliar de la caña de azúcar y asintomáticas en las provincias Mayabeque, Matanzas, Camagüey y Las Tunas presentan similitudes morfológica, serológica, patogénica y molecular.
3. Las secuencias de ADN obtenidas presentan 100% de homología con la cepa GPE PC73 de Guadalupe, KO 905 de Estados Unidos y el gen del ARN ribosomal 23S de Brasil.

6. RECOMENDACIONES

1. Mantener el monitoreo de la enfermedad en áreas comerciales y experimentales con una confirmación serológica del diagnóstico.
2. Ampliar los estudios de caracterización del organismo causal incluyendo otras provincias del país.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aday, D. O. y Barroso M. F. (2001). Sanidad Vegetal En: Instructivo Técnico para Jefes de lotes. INICA, p. 31-33.

Aday, D. O.; García, P. H.; Barroso, M. F. y Díaz, M. F. (2003). Uso del Glifosato para el saneamiento de la escaldadura foliar de la caña de azúcar en áreas comerciales. Centro Agrícola, 30 (1): p.41-45.

Agrios, G. 1997. Plant Pathology. Como se defienden las plantas de los patógenos. Capítulo 5. Fourth Edition. Academic Press, San Diego. p 98-117.

Alves, B., Carballo, J., Alonso, G. y Oropesa, M. (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

Alvez, Beatriz, Alonso, Guillermina, Oropeza, Maira, Genotipificación y perfil bioquímico de aislados de *Xanthomonas albilineans* en Venezuela. Interciencia [en línea] 2016, 41 (Noviembre-Sin mes): [Fecha de consulta: 2 de mayo de 2018] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33948191002>>ISSN 0378-1844

Arauz, C. I. F. (1998): Fitopatología, un enfoque agroecológico. Universidad de Costa Rica, 467p.

Bachem, C., Oomen, R., Visser, R. (2000) Transcript imaging with cDNA-AFLP: a step-by-step protocol. Plant Molecular Biology Report. 16:pp.157–173.

Barroso, G. (2008). Evaluación de híbridos de Caña de Azúcar ante la presencia de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson y su influencia en el rendimiento. Tesis en opción al Título Académico de Master en Sanidad Vegetal, Universidad de Matanzas, p. 35-40.

- Birch R. G. (2001): Pathogen profile *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. *Molecular PlantPathology*2, p. 1-11.
- Bressiani, J. A., Sanguino, A., Burnquist, W. L., Vencovsky, R. y da Silva, J. A. (2007): Breeding sugarcane for leaf scald resistance: a genetic study. *Journal American SocietySugarCaneTechnologists* 27:15-22.
- CABI (2011) Crop Protection Compendium Disponible en <http://www.cabi.org/cpc>. (Consultado 10/09/2016)
- Carvajal, O.; Barroso, G.; Ruffin, Yordanka.; Pérez, J. R.; Delgado, Mercedes y Pellón, Yenima (2007). Medidas alternativas de control para el cultivo de variedades de caña de azúcar susceptibles a la escaldadura foliar *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson para la necesidad actual. Memorias del 60 Aniversario de la EPICA "Antonio Mesa". Jovellanos, Cuba, p. 6.
- Chávez, M. R. (2000). 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., p.85.
- Champoiseau, P. (2006): *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, p.171
- Chávez, M (2008): Uso de la caña de azúcar como forraje. Revista Especializada, Ventana lechera. San José, Costa Rica. Ed. No. 10, Año 3: 45-51

Chinaea, M. A. y Milanés, R. N. (2008). Enfermedades de la caña de azúcar. En: Temas selectos de la caña de azúcar. Universidad Veracruzana, México, p. 72-85.

Chinaea, M. A.; Nass, H.; Davoin, C. y Diez, María Dolores (2000). Enfermedades y daños de la Caña de Azúcar en Latinoamérica, Imprecolor S. A. Barquisimeto, Venezuela, p.108.

Comstock, J.C & Irey, M. (1992). Detection of the sugarcane leaf scald pathogen *Xanthomonas albilineans*, using tissue blot immunoassay, ELISA and isolation techniques. *Plant Disease* 76:1033-1035

Crest S, Tulman-Neto A, Figueira A. 2001. Detection off single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining .*Plant Molecular Biology Reporter* 19:299-306.

Daugrois, J. H. ; Champoiseau, P. ; Boisne-Noc, R. y Joseph, S. (2000). Aereal dissemination of *Xanthomonas albilineans*. AnnualReport CIRAD. p.20.

Daugrois, J. H.; Dumont, V.; Champoiseau, P.; Costet, L.; Boisne-Noc, R. y Rott, P. (2003^b). Aerial contamination of sugarcane in Guadeloupe by two strains of *Xanthomonas albilineans*. *European Journal of Plant Pathology* 109:p.445-458.

Daugrois, J. H., Boisne-Noc, R, Champoiseau,P. y Rott, P. (2012) The Revisited Infection Cycle of *Xanthomonas albilineans*, the Causal Agent of Leaf Scald of Sugarcane. *Functional Plant Science and Biotechnology*©2012 Globa

Daugrois, J. H.;Champoiseau, P. y Rott, P. (2006). Impact of rainfall on epiphytic colonization of sugarcane by the leaf scald pathogen and associated plant infection. In: Abstracts of the VIIIth Pathology Workshop of ISSCT, Guadeloupe, France, p.44. I Science Book.pp.92-97

Daugrois, Jean Heinrich; Rosiane Boisne-Noc, and Philippe Rott. (2014) Leaf Surface Colonization of Sugarcane by *Xanthomonas albilineans* and Subsequent Disease Progress Vary According to the Host Cultivar. *Plant Disease*, 98(2): 191-196.

Davis, M. J.; Rott, P.; Baudin, P. y Dean, J. L. (1994): Evaluation of selective media and immunoassay for detection of *Xanthomonas albilineans*, causal agent of sugarcane leaf scald disease. *Plant Disease*, 78: p. 78-82.

D'Agostini, S., Rebouças, M. M., Batista A. y Vitiello, N. (2015): La caña de azúcar: www.biologico.agricultura.sp.br/docs/pag/v5...dagostini.htm

De Souza y Silva, M. (2005). Caracterização serológica, molecular e patogênica de isolados de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson agente causal da escaldadura da Cana de Açúcar. (Tesis de Maestría en Fitopatología). Universidad de Sao Paulo. Escuela Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, p.61.

D'estefano, S. A. L., Harakava, R., Almeida, I. M. G., Rodríguez Neto, J. Ferreira, M. and Balani, D. M. (2005): Identification of different species of *Xanthomonas* pathogenic to sugarcane by specific primers. *Bacteriología Vegetal*, Instituto Biológico.

Díaz, R., Marisela (2000). Escaldadura foliar de la caña de azúcar en Cuba: Caracterización, diversidad y diagnóstico molecular de su agente causal. Tesis doctoral, Ciudad de La Habana, p. 112.

Duarte Díaz, V., Fernández, E., Cunha, M.G., Pieretti, I., Hincapie, M., Roumagnac, Ph., Comstock, J.C., Rott, Ph. 2018. Comparison of loop-mediated isothermal amplification, polymerase chain reaction, and selective isolation assays for detection of *Xanthomonas albilineans* from sugarcane. *Trop. plant pathol.* <https://doi.org/10.1007/s40858-018-0216-2>.

FAO (2016): El cultivo de la caña de azúcar. Disponible en: <http://azuquita2012>. Centro de información del Paraquat en nombre de Syngenta Crop Protection-AG. 25 de abril de 2015.

Frishman, D., Albermann, K., Hani, J., Heumann, K., Metanomski, A., Zollner A. and Mewes, H.W. (2001) Functional and structural genomics using PEDANT. *Bioinformatics* 17: 44–57

Garcés, F. F. (2003). Manejo preventivo de los principales problemas fitopatológicos de la Caña de Azúcar en Ecuador. Memorias de la reunión sobre el cultivo de la Caña de Azúcar en Ecuador. Guayaquil, p. 47-74.

Garcés, F. y Valladares, Carmen (2006). 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, N0 2, p. 4.

García, L. y Noa, J. N. (1998). Obtención de plantas libres de patógenos. Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Eds: Pérez, P. J. N, Alvarado, Y., Gómez, K. R, Jiménez, G. E. Orellana, p. 135-148.

Gonçalves, E.R; Rosato, Y. B. (2002): Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species based upon 16S-23S rDNA intergenic spacer sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52 (2): 355-361

González, R.; Carvajal, O.; Tamayo, Mónica, Montalván, J.; García, H. y Rott, P. (2008). Contribución al muestreo y evaluación de la escaldadura foliar de la Caña de Azúcar. *Cuba & Caña* 2:42-47

Guzman, R., Angel, S., Victoria, K. & Alvarez, A. (1997). Diagnosis of leaf scald of sugarcane, *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, in sugarcane. *Fitopatología Colombiana* 21(1):10-17.

Referencias Bibliográficas

Honeycutt, R.J.; Sobral, B.W.S.; McClelland, M. (1995): tRNA intergenic spacers reveal polymorphisms diagnostic for *Xanthomonas albilineans*. *Microbiology, Reading*, v. 141, p. 3229-3239.

Hernández, R., Fontanella, J., Noa, J.C, Manso, R., Pichardo, T., Cárdenas, H. & Igarza, Y. (1995). Electroterapia, nueva técnica para el saneamiento a virus en *Allium sativum* L. *Cuaderno de fitopatología* 54:153-157.

Huerta Lara, M.; Cárdenas Soriano, E. y Rojas Martínez, R. (2009): Oclusión de haces vasculares para evaluar resistencia de caña de azúcar a *Xanthomonas albilineans*. INCI. [online]. abr. 2009, vol.34, no.4 p.247-251. Disponible en la World Wide Web: ISSN 0378-1844.

Huerta Lara, M.; Ortega Arenas, L. D.; Landeros Sánchez, C.; Fucikovsky Zak, L. y Marín, García, M. (2003). Resistencia de variedades comerciales de caña de azúcar a la escaldadura de la hoja [*Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson]. *Agrociencia, Colegio de Posgraduados. Texcoco, México*, 37 (5):511-519.

INICA (2013) Método de muestreo de enfermedades principales. Escaldadura foliar. Manual de procedimientos del SEFIT. Actualización Editores Rodríguez, M., Alfonso I., Rodríguez, E. y Acevedo, R. Grupo Azucarero, AZCUBA. pp.20-21

INICA (2018) Escaldadura foliar. En Informe a la XXV Reunión Nacional de Variedades, Semilla y Sanidad Vegetal, pp.90-91, La Habana

James, L. G. (2005). Pests and diseases of sugarcane. *SugarCane International* 23(1):3-14.

Jiménez, Odalis.; Contreras, Nancy. y Nass, H. (2004). *Xanthomonas albilineans* agente causal de la escaldadura foliar de la Caña de Azúcar (*Saccharum* spp.) en los estados Lara y Yaracuy. *Rev. Fac. Agron. Uruguay*, 21 (3):233-245.

Jorge, S. H.; Bernal, N.; Jorge, I.; Mesa, J.; González, F.; González, A.; Cabrera, L. (2011). Capítulo 6. Selección. En Normas y procedimientos del mejoramiento genético de la caña de azúcar en Cuba. Jorge, H y Jorge I. Editores. Rev. Cuba & Caña Edición Especial. pp. 187-190

Kretz, J., Kerwat, D., Schubert, V., Grätz, S., Pesic, A., Semsary, S., et al. (2015). Total synthesis of albicidin: a lead structure from *Xanthomonas albilineans* for potent antibacterial gyrase inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* 54,1969–1973.doi: 10.1002/anie.201409584

Koike, H. (1980).The aluminium cap method for testing sugarcane varieties against leaf scald disease. *Phytopathology*, p. 317-319.

Ling-Hong Lin, Mbuya Sylvain Ntambo, , Philippe C.Rott,Qin-NanWang, , Yi-HuaLin, , Hua-YingFu, San-Ji Gao. 2018. Molecular detection and prevalence of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of sugarcane leaf scald, in China. *Crop Protection*, 109:17-23

Martin, J. P. y Robinson, P. E. (1961). Leaf scald. In: Sugar Disease in the World, 1. J.P. Martin, E.V. Abbott, C.G. Hughes, eds. Elsevier Publishing Co., Amsterdam, v. 1, p. 79-107.

Martin, Marianela (2014): La caña es más que azúcar. Juventud Rebelde Diario de la Juventud Cubana. 3 de septiembre. Edición Digital.

Matos, Madyu (2002). Escaldadura foliar: Evaluación de métodos para el saneamiento y comportamiento de variedades comerciales de Caña de Azúcar. Tesis de Maestría. Universidad de la Habana. Facultad de Biología, p.60.

Matos Trujillo, Madyu, Díaz Solares, Maykelis, Samaniego Fernández, Luz María, Cortegaza Ávila, Leydis, Pérez Milian, José R, Pellón Guzmán, Yenima, Rufín Hernández, Yordanka y Pérez Pérez Yosel (2017). Expression of the peroxidase enzyme in hybrid *Saccharum* sp. Plants inoculated with

Xanthomonas albilineans Ashby (Dowson). Pastos y Forrajes, Vol. 40, No. 3, July-September, 181-186, / Peroxidase in hybrid *Sacharum* sp. plants

Matos, Madyu.; Peralta, E. L.; Pérez, M, J. R.; Cortegaza, L. y, Santana, O.; China, A. y Carvajal, O. (2003). Evaluación de la presencia de los Serovares I y III de *Xanthomonas albilineans* en plantas procedentes de áreas comerciales y vitroplantas de Caña de Azúcar. *Protección Vegetal*. 18(3):159-161.

Mensi, I, J., Girard, C., Pieretti, I., Larbre, F., Roumagnac, P. Royer, M. y Rott, P. (2013): First report of sugarcane leaf scald in Gabon caused by a highly virulent and aggressive strain of *Xanthomonas albilineans*. *PlantDisease*, 97(7):988

MINAZ-INICA (2008). Informe a la XVI Reunión Nacional de Variedades, Semilla y Sanidad Vegetal, Sancti Spiritus, p.93.

Montan Rojas, R. (2009). Inducción de las isoenzimas peroxidases en la interacción caña de azúcar-*Xanthomonas albilineans*. Tesis de Diploma para obtener el título de ing Agrónomo. 45pp.

Nunes, M. P., Mehta, A., Aguiar, P. H., Cia, E., Pizzinato, M. A., Chiavegato, E. J., Mehta, Y. R. (2009): Análise da diversidade genética de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *Malvacea* rumbo algodoeiro. *Summa Phytopathol*. 35(2). (ISSN 0100-5405)

Ovalle, W. (2007). Determinación del efecto de cuatro enfermedades en la producción de la Caña de azúcar. CENGICAÑA. MEMORIA. Eventos históricos y logros 1992-1997. Guatemala, p.85.

Ovalle, W; Barrera, M. y García, S. (2007). Región de muestreo en Caña de Azúcar, para la detección de la bacteria causante de la escaldadura foliar *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson. CENGICAÑA. Memoria.

Presentación de resultados de investigación. Zafra 2006-2007. Guatemala, p. 232.

Pan, Y. B., Grisham, M.P., Burner, D.M., Legendre, B.L. and Wei, Q. (1999): Development of polymerase chain reaction primers highly specific for *Xanthomonas albilineans*, the causal bacterium for sugarcane leaf scald disease. *PlantDis.* 83, 218-222

Peralta, E., L.; Martínez, B.; Martín, D. y Jones, P. (1997). Quality control for the production of plant-free plantlets in Cuban sugarcane biofactories. ISSCT Pathology and Molecular Workshop, Abstracts, South Africa, p. 136-143.

Pérez, M. J. R. (2002). Evaluación de la resistencia varietal y el control de la escaldadura foliar *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson de la Caña de Azúcar en Cuba. Informe Final de Proyecto. (101.141) INICA, p.38.

Pérez, M. J. R.; Matos, M.; Montalván, J.; Peralta, E. L.; Pérez, G; Carvajal, O. y Chinaea, A. (2003): Desarrollo de la escaldadura foliar *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson en cuba: patógeno, variedades y clima. *Protección Vegetal.* 18(3):162-167.

Pérez, M. J. R.; Chinaea, A.; Matos, Madyu y Montalván, J. (2000). Causas de la propagación y desarrollo de la escaldadura foliar de la caña de azúcar en Cuba. Resúmenes, 15 Aniversario EPICA Stgo. de Cuba, p. 32-33.

Pérez, M. J. R.; Matos, Madyu.; Chinaea, M. A. Montalván, J. y Pérez, G. (2002). Desarrollo y características epidemiológicas de la escaldadura foliar *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson de la caña de azúcar en Cuba. *Revista de Protección Vegetal.* 17 (3):181-182.

Pérez, M. J. R.; Matos, Madyu.; Pérez, G.; Montalván, J.; Aguiar, E.; Peralta, Esther, Lilia. y Chinaea, A. (2004). Brote epifítico de la escaldadura foliar de la caña de azúcar *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson: consecuencias

actuales y futuras. Diversificación 2004. Congreso Internacional sobre Azúcar y Derivados de la caña. Memorias. La Habana. Cuba, p. 97-103.

Pérez Pérez, Y., Pérez Milian, J. R., La O Echevarría, M y Pellón Guzmán, Y. (2016) Sugarcane leaf scald: symptom expression in relation to sucrose content and pathogen population density in the juice of infected stalks. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists*, vol. 29 (1598-1601).

Persley, G. J. y Ryan, C. C. (1976). Epidemiology of leaf scald in the Moreton district of Queensland. *Proc. Queensl. Soc. SugarCaneTechnol.*, p. 79-82.

Pieretti, I., Pesic, A., Petras, D., Royer, M., Sussmuth, R. D., Cociancich, S. (2015): What makes *Xanthomonas albilineans* unique amongst Xanthomonads? *Frontiers in Plant Sciences*. V. 6, p. 1-7

Pieretti, I. et al., (2009) The complete genome sequence of *Xanthomonas albilineans* provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited Xanthomonadaceae. *BMC Genomics* 10, 616

Pieretti, I., Royer, M., Barbe, V., Carrere, S., Koebnik, R., Couloux, A. Darrasse, A., Gouzy, J., Jacques, M., Lauber, E., Manceau, C., Mangenot, S., Poussier, S., Segurens, B., Szurek, B., Verdier, B., Arlat, M. y Rott, P. (2012) Genomic insights into strategies used by *Xanthomonas albilineans* with its reduced artillery to spread within sugarcane xylem vessels. *BMC Genomics*, 13:658 Disponible en: www.biomedcentral.com/1471.2164/13/658 (Consultado 25/09/2014)

Racedo, J., Perera, M. F., Bertani, R., unes, C., Gonzalez, V., Cuenya, M.I., A'Hont, A., Weling, B. y Castagnaro, A. P. (2015): Molecular diagnostic of both Brown and orange sugarcane rust and evaluation of sugarcane brown rust resistance in Tucuman, Argentina usig molecular markers associated with Bru 1 a Broad-range resistance allele. *SugarTech*. BOJ 10.1007/s12355-015-0404-Z.

Ricaud, C. (1975). Factors affecting the severity of leaf scald disease of sugarcane in different countries. Proc. IndianSugarTechnol. Assoc., SeminarPaper, p. 6.

Ricaud, C., y Ryan C. C. (1989). Leaf scald En: Disease of sugarcane. Major disease. Eds: C. Ricaud, B. T. Egan, A. G. Gillaspie Jr., C. G. Hugues. Amsterdam. TheNetherlands: ElsevierScience Publisher, p.39-58.

Rivera, N.; Hevesi, Mary.; Stefanova, Marucia y Albornoz, A. (1979). Dos nuevas enfermedades bacterianas en Caña de Azúcar en Cuba. Primera Jornada Científica de Sanidad Vegetal, p. 25-31.

Rodríguez M, Rodríguez E, Alfonso, I. (2008). Experiencia cubana en un sistema para el Manejo Integrado de Plagas en la Caña de Azúcar. ATAC 1, 17-23.

Rossetto, E. y Díaz S. (2015): Doenças Bacterianas. Agencia Embrapa de Informação Tecnológica, AGEITEC, Disponible en: www.agencia.cnptia.embrapa.br/contogo1_78_221220061) ISSN: 2307-695X. RNPS: 2362

Rott, P.; Marguerettaz, M ; Fleite, L ; Cociancich, S. y Girard, J. C. (2010). Unravelling pathogenicity of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of sugar cane leaf scald. Pro. Int. Soc. SugarCaneTechnol., Vol. 27, p.11.

Rott, P. Mohamed, I. S., Klett, P., Soupa, D., de Saint-Albin, A. Feldmann, P. y Letourmy, P. (1997): Resistance to Leaf Scald Disease Is Associated with Limited Colonization of Sugarcane and Wild Relatives by *Xanthomonas albilineans*. Phytopathology, Vol. 87, No. 12, pp. 1203

Rott, P. y Davis, M. J. (1995). Recent advances in research on variability of *Xanthomonas albilineans* causal agent of sugarcane leaf scald disease. In: Proceeding of XXII Congress ISSCT, Colombia, p. 43-49.

Rott, P. y Davis, M. J. (2000). Leaf scald. In: A guide to Sugarcane diseases. CIRAD and ISSCT, p. 163-169.

Rott, P. ; Davis, M.J. y Baudin, P. (1994). Serological variability in *Xanthomonas albilineans* causal agent of sugarcane leaf scald disease. *PlantPathology*, p. 344-349.

Rott, P. ; D. Soupa. ; Brunet, P. Feldmann, y P. Letourmy (1995). Leaf scald (*Xanthomonas albilineans*) incidence and its effect on yield in seven sugarcane cultivar in Guadeloupe. *PlantPathology*, p. 1075-1084.

Salomón García-Juárez H, Carlos F. Ortiz-García, Sergio Salgado-García, Apolonio Valdez-Balero, Hilda V. Silva-Rojas y Werner R. Ovalle-Sáenz. 2015. Presencia de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson en caña de azúcar en la Chontalpa, Tabasco, México. *Fitotec. Mex. Vol. 38 (4) 2: 398-404.*

Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989): *Molecular cloning: a laboratory 2a ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, Nueva York.

Sauntally, A. S.; Medan, H. y Autrey, L. J. (1995). Detection, transmission and control of leaf scald of sugarcane caused by *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson. In *International Society of Sugar Cane Technologists Congress. 22. Cartagena Proceedings. Cali. Tecnica; Vol. 2, p. 477-484.*

Schneider, K.L., Marrero, G., Alvarez, A. M., Presting, G. (2010): Classification of plant associated bacteria using RIF, a computationally derived DNA marker. *Molecular Biosciences and Bioengineering University of Hawaii at Manoa, 1955 East West Rd. Ag. Sci. N0. 218.*

Stand, David (2011): *Xanthomonas albilineans: Taxonomía: Tomado de Garrity, G. M, 2006, Disponible en*<http://zipcodezoo.com>

Taher-Kane. (2010). Bases metodológicas para el Manejo Integrado del raquitismo de los retoños de la caña de azúcar en Irán. Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central de Las Villas Marta Abreu. 152 pp

Tsai, C.C., Lin, C.P. & Chen, C.T. (1990). Characterization and monoclonal antibody production of *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, the causal agent of sugarcane leaf scald disease, *Plant Protection, Bull*, 32:125-135.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. y Higgins, D. G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24):4876-82

Tokeshi, H. (1997). Doencas da Cana de Açúcar. ESALQ./USP. Editora Agronómica, CERES Ltda/SA, p. 10-13.

Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K. & Swings, J. (1995). Reclassification of *Xanthomonas*, *Int. J. Systematic Bacteriology* 45:472-489.

Verdecia y La O. (2012). Software para el registro de resistencia de los genotipos ante diferentes enfermedades. Versión 1.1. Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar. Disponible en www.inica.azcuba.cu Consultado Enero 2017.

Victoria, J. I., Guzmán, F. A. (1995). Enfermedades de la Caña de Azúcar en Colombia. En: C. Cassalett, J. Torres, C. Isaacs (eds). El cultivo de la Caña en la zona azucarera de Colombia. CENICAÑA. Cali, Colombia, p. 265-293.

Zardón, M.A., Gallo, A., Mesa, J. M., Arencibia, A., Zamora, L., Martínez, Y., Sautié, M., Casas, M., La O, M. (2012): "Detección de infecciones mixtas en genotipos de caña de azúcar en Cuba", *Prot. Veg.*, 27(2): 77-84.

Referencias Bibliográficas

Zhang R. Y, H. L. Shan, W. F. Li, X. Y. Cang, X. Y. Wang, J. Yin, Z. M. Luo, and Y. K. Huang (2017). First Report of Sugarcane Leaf Scald Caused by *Xanthomonas albilineans* in the Province of Guangxi, China. *Plant Disease* 101(8):1541.

Zhang, L y Birch, R. G. (1997) The gene for albicidin detoxification from *Pantoea dispersa* encodes an esterase and attenuates pathogenicity of *Xanthomonas albilineans* to sugarcane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2;94(18):9984-9.