

ESTUDIO DE LA RESISTENCIA DE VARIEDADES COMERCIALES DE LA CAÑA DE AZÚCAR AL RAQUITISMO DE LOS RETOÑOS EMPLEANDO EL MÉTODO DE TINCIÓN POR TRANSPIRACIÓN

J. R. Pérez, Madyu Matos[✉] y Yamilé Figueredo

ABSTRACT. Ratoon stunting (RSD) is probably the most important sugarcane disease affecting a great number of productive varieties. The causal agent is *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* lodged in xylem vessels. Seed hydrothermal treatment is commonly applied for its control, but it can not fully remove the pathogen. However, after a thermal treatment a yield increment is observed, which has been considered as a result of an effective sanitation. On the other hand, the visual diagnosis of this disease is difficult, since external symptoms are confused with other pathologies; thus, other diagnostic techniques were developed enabling to detect disease appearance. This study applied staining by transpiration method (STM) to early estimate an effective sanitation by hydrothermotherapy. A differentiated varietal performance against RSD was proved, it ranging from a little difference between treated and inoculated plants in My5514 until a very marked difference in C120-78. Percentage of functional vessels (% VF) confirmed the results from other investigations in My5514 (resistant) and CP31-294 (susceptible). Varietal sanitation in Ja60-5, C1051-73 and CP52-43 was analyzed through phase contrast (CF) and STM when diseased stalks were thermally treated by means of different combinations of times and temperatures. Bacterial appearance was recorded by CF; nevertheless, when studying % VF in every case, it surpassed 85 % after submitted to a treatment under 50.5°C for two hours. A nice correlation was registered between weight and % VF in treated and inoculated My5514 and C120-78. These results prove this useful method to evaluate sanitation against RSD, which can be taken into consideration for seed bank qualification.

Key words: sugarcane, *Clavibacter xyli*, disease resistance, pest control methods, staining by transpiration

RESUMEN. El raquitismo de los retoños es probablemente la enfermedad más importante de la caña de azúcar, afecta un gran número de variedades de la producción. El agente causal es la bacteria *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, la cual se aloja en los vasos del xilema. El tratamiento hidrotérmico a la semilla es el método más usado para su control, pero no logra una total erradicación del patógeno. Sin embargo, después de un tratamiento térmico se observa un incremento en el rendimiento, siendo este el criterio empleado para medir la efectividad del saneamiento. Por otra parte, el diagnóstico visual de la enfermedad se dificulta, ya que los síntomas externos pueden confundirse con otras patologías. Sobre la base de esta dificultad, se han desarrollado otras técnicas de diagnóstico que permitan detectar la presencia o no de la enfermedad. En este trabajo se empleó el Método de Tinción por Transpiración (STM) para evaluar tempranamente la efectividad del saneamiento por hidrotermoterapia. Se pudo demostrar un comportamiento diferenciado de las variedades ante el raquitismo de los retoños (RSD), que va desde muy poca diferencia entre las plantas tratadas e inoculadas en My5514 hasta una diferencia muy acentuada en C120-78. El comportamiento del porcentaje de vasos funcionales (% VF) corroboró los resultados alcanzados en otras investigaciones con My5514 (resistente) y CP31-294 (susceptible). Se analizó el saneamiento de las variedades Ja60-5, C1051-73 y CP52-43 mediante el contraste de fases (CF) y el STM, cuando los tallos enfermos se trataron térmicamente con diferentes combinaciones de tiempo y temperaturas. Se encontró la presencia de la bacteria utilizando el CF; sin embargo, al analizar % VF en todos los casos fue superior al 85 % después de un tratamiento de 50.5°C/2 horas. Se obtuvo una buena correlación entre el peso y el % VF en las variedades My5514 y C120-78 tratadas e inoculadas. Estos resultados confirman la utilidad de este método para la evaluación del saneamiento al RSD, criterio que puede utilizarse para la calificación de los bancos de semilla.

Palabras clave: caña de azúcar, *Clavibacter xyli*, resistencia a la enfermedad, métodos de control de plagas, tinción por transpiración

INTRODUCCIÓN

El raquitismo de los retoños, producido por la bacteria *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, se considera entre las enfermedades de la caña de azúcar más estudiadas en los últimos años. Datos experimentales muestran una reducción del rendimiento superior al 30 % como prome-

Dr.C. J. R. Pérez, Investigador Titular; Madyu Matos y Yamilé Figueredo, Investigadoras del Departamento de Protección de Plantas, Estación Provincial de Investigaciones de la Caña de Azúcar (EPICA), Jovellanos, Matanzas.

✉ pp@epica.atenas.inf.cu

dio en 20 variedades, alguna de las cuales sufren una afectación superior al 50 % del peso en las plantas enfermas (1, 2). Estudios realizados en áreas de producción reflejan que durante la zafra 1993-1994 se perdió en Cuba el 19 % de la cosecha, como resultado de la propagación alcanzada por el raquitismo en los campos cañeros cubanos (3).

Históricamente, se ha relacionado la importancia de la enfermedad no solamente con las pérdidas directas que produce, sino también con la intolerancia de la mayoría de las variedades a la convivencia con el patógeno. Este aspecto ha experimentado cierta modificación que coincide con la innovación en los métodos para estudiar la resistencia varietal. Se han desarrollado diferentes técnicas de diagnóstico que permiten detectar la presencia del patógeno y se han utilizado en la evaluación de la resistencia de las variedades, entre ellas se encuentran el contraste de fases (4), autofluorescencia del metaxilema (5), *Dot-Blot* (5, 6), *Tissue Blot* (7, 8), STM (9, 10, 11, 12), EB-EIA (5, 13), PCR-ELISA (14) y diferentes protocolos de PCR (15, 16).

La tinción por transpiración (STM) inicialmente desarrollada por algunos autores (9, 10) y modificada por otros (11), puede ser aplicada en los programas de cruzamiento y para la selección de variedades resistentes (17); este método ha resultado más eficiente para este objetivo que el contraste de fases y la autofluorescencia del metaxilema (18).

El objetivo del presente trabajo es evaluar la resistencia al RSD en cinco variedades comerciales de caña de azúcar utilizando el método de tinción por transpiración (STM).

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento 1. Se estudió la reacción de cinco variedades de caña de azúcar ante el RSD, empleando plantas sanas y enfermas. El material se trató con agua caliente a 50°C/3h (19) remojado previamente en agua a temperatura ambiente. De cada tratamiento (sano y enfermo) se sembraron tres réplicas en surcos de 6 m. Las variantes enfermas se inocularon sumergiendo los extremos de los propágulos durante cinco minutos en jugo extraído de tallos de la variedad CP31-294 (enferma de RSD). Se incluyeron como testigo susceptible CP31-294 y My5514 como resistente (2). A los 10 meses de edad, de cada réplica se seleccionaron 10 tallos al azar para determinar el porcentaje de vasos funcionales (%VF) mediante la tinción de los vasos del xilema por transpiración (STM).

Experimento 2. Se estudió el efecto de la enfermedad en el retoño de dos variedades: My5514 resistente y C120-78 susceptible. Las parcelas sanas se establecieron empleando el tratamiento hidrotérmico a 50.5°C/2h (19) y las enfermas por inoculación de los trozos con jugo de tallos enfermos. Se plantaron tres réplicas por tratamiento; cada tratamiento consistió en una parcela de dos surcos de 6 m cada una; se tomaron al azar 10 muestras de

tres tallos por réplica para estudiar las posibles correlaciones entre el peso y el %VF en C120-78, así como la relación entre el peso de las variantes sanas y enfermas de ambas variedades.

Experimento 3. Se evaluó el control del RSD en tres variedades de caña de azúcar tratadas térmicamente. Se estudiaron las variedades Ja60-5, C1051-73 y CP 52-43, tratadas térmicamente con diferentes combinaciones de tiempo y temperatura (50.5°C/2h, 53°C/20min., y un testigo sin tratar). Se analizó el saneamiento por contraste de fases (20) y STM.

La tinción de los haces en los tres experimentos se desarrolló según el método descrito por Chagas y Tokeshi (9) y los análisis estadísticos según el paquete estadístico STATISTIC siguiendo las recomendaciones de Sigarrosa (21).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La diferencia del comportamiento entre las variedades es notable (Tabla I). El concepto de la no existencia de variedades resistentes se modifica con los resultados obtenidos con la My5514, que aún en condiciones de inoculación artificial mantiene su resistencia, coincidiendo con otros planteamientos (2), de que en esta variedad no se afecta el rendimiento por la infección de RSD. Se destaca también que en la C111-79 no inoculada, el 70 % de los tallos analizados presentaron el 100 % de los vasos funcionales. La C120-78 es una variedad de un potencial agroproductivo alto, por lo que puede producirse una alta afectación en el rendimiento agrícola cuando está enferma de RSD. Consideramos que la forma en que se agrupan las variedades, después del análisis estadístico, es el mismo orden en el que se debe representar su comportamiento ante la enfermedad.

Tabla I. Porcentaje de vasos funcionales observados en los tallos de cinco variedades de caña de azúcar tratadas a 50.5°C/2h e inoculados con RSD

Variedad	% VF		
	Tratada	Inoculada	Diferencia.
C111-79	99.14	78.52	20.62 b
C323-68	90.40	74.28	16.12 b
C120-78	93.76	22.28	71.48 d
CP31-294	82.28	52.63	29.65 c
My5514	96.92	89.49	7.43 a

DE= 6.59 LSD=5 % CV= 8.5
Letras desiguales difieren significativamente

Se han obtenido diferencias entre variedades de caña de azúcar al estudiar la incidencia del RSD en campos de caña de azúcar, utilizando como método de evaluación el TBIA (*tissue blot immunoassay*), la incidencia al RSD varió entre 1-98 % de vasos colonizados, dependiendo de la variedad. Aquellas variedades con menor incidencia al RSD tenían menor número de vasos colonizados, parámetro utilizado para medir la resistencia.

Al comparar una cosecha de primer retoño (segundo corte) de las variedades My5514 y la C120-78, se observó que se mantuvo en esta fase el mismo comportamiento observado en caña planta para ambas variedades como se representa en la Tabla II. Los dos tratamientos (tratadas e inoculadas) de la My5514 y las tratadas de la C120-78 difieren significativamente de las inoculadas de esta última en cuanto al %VF, lo cual confirma la utilidad de este método para seleccionar variedades resistentes y susceptibles al RSD al comparar plantas tratadas e inoculadas, lo cual coincide con otros autores (10).

Tabla II. Comportamiento del %VF y el peso de la muestra en el retoño de dos variedades contrastantes respecto a su tolerancia al RSD

Variedad	Categoría	Tratamiento	%VF	Peso
My5514	Tolerante	Tratada	93.30 a	3.83 a
		Inoculada	85.30 a	3.35 a
C120-78	Susceptible	Tratada	83.30 a	3.65 a
		Inoculada	27.70 b	2.78 b

DE= 0.60 LSD=5 % Letras desiguales difieren estadísticamente

Por otra parte, también se observa la afectación en el peso de las plantas inoculadas, en la variedad C120-78 con respecto a las tratadas. Al analizar la correlación entre el peso y el porcentaje de vasos funcionales, se demuestra que puede ser utilizado el método de tinción por transpiración para medir la severidad de la enfermedad y, por tanto, se establecen las posibles afectaciones como resultado de la infección por *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* en variedades susceptibles (Figura 1).

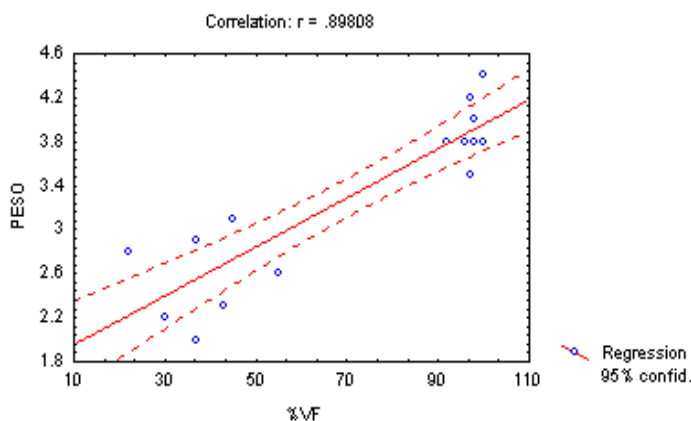


Figura 1. Relación entre el porcentaje de vasos funcionales (VF) y el peso de la caña en la variedad susceptible C120-78

Al analizar el saneamiento en tres variedades con diferentes combinaciones de tiempo y temperatura (Tabla III), se encontró la presencia de la bacteria por contraste de fases; sin embargo, el porcentaje de vasos funcionales (% VF) obtenido por STM fue superior al 85 % después de un tratamiento de 50.5°C/2h, lo cual confirma la utilidad de este método para la evaluación del sa-

neamiento al RSD, criterio que puede utilizarse para la calificación de los bancos de semilla. Se realizó una comparación entre el TBIA y el STM en cuanto a similitud de los métodos para la evaluación de la resistencia de variedades de caña de azúcar ante el RSD (11) y se encontró una alta correlación entre variedades resistentes, lo cual confirma la utilidad del STM como método alternativo para evaluar la resistencia al RSD en condiciones controladas.

Tabla III. Evaluación del control del RSD en tres variedades de caña de azúcar en tratamiento térmico mediante las técnicas de CF y STM

Tratamiento	Variedad	Número células <i>C. xyli</i>	Propagación	Intensidad
Testigo	Ja60-5	2.067 ^a	96.68 ^a	66.86 ^a
	C1051-73	2.540 ^a	98.86 ^a	56.88 ^a
	CP52-43	1.707 ^a	83.33 ^a	56.00 ^a
50.5°C/2h	Ja60-5	0.313 ^b	23.33 ^c	18.66 ^b
	C1051-73	0.493 ^b	40.00 ^b	27.33 ^b
	CP52-43	0.590 ^b	40.00 ^b	32.86 ^b
53°C/20 min	Ja60-5	0.580 ^b	35.33 ^{bc}	27.33 ^b
	C1051-73	0.573 ^b	36.66 ^{bc}	28.00 ^b
	CP52-43	0.360 ^b	33.35 ^{bc}	17.33 ^c

CONCLUSIONES

- La técnica de tinción de los vasos del xilema por transpiración (STM) puede resultar un método efectivo para evaluar la resistencia de las variedades ante el raquitismo de los retoños, siempre que se empleen como testigo variedades resistentes y susceptibles.
- Existe un comportamiento marcadamente diferenciado entre las variedades, por lo que la presencia de variedades resistentes es una nueva alternativa para controlar la enfermedad.
- Existe correlación entre el porcentaje de vasos funcionales y el desarrollo de la plantación.

RECOMENDACIONES

Introducir la técnica de tinción de los vasos del xilema por transpiración en el programa de selección de variedades, con el objetivo de estudiar su resistencia a la enfermedad antes de ser recomendadas para la producción, así como para evaluar el saneamiento al RSD en los bancos de semilla y parcelas experimentales.

REFERENCIAS

1. Pérez, J. R., y López, M. Importancia de la enfermedad raquitismo de los retoños de la caña de azúcar en Cuba. Ciencias Agrícolas, 1983, vol. 17, p. 3-10.
2. Pérez, J. R. El raquitismo de los retoños de la caña de azúcar en Cuba. [Tesis de Grado], 1985. 112 h.
3. Pérez, J. R. y Delgado, G. Pérdidas por RSD en caña de azúcar y factores que intervienen en el éxito de las campañas de control. En: Jornada del 30 Aniversario del INICA, La Habana. 1994.

4. McFarlane, S.; Bailey, R. A. y Subramoney, S. Progress in the control of ratoon stunting disease and the current distribution in the South Africa Sugar Industry. Abstracts of the Pathology and Molecular Workshop, South Africa. 1997
5. Hoy, J. W.; Grishan, M. P. y Damann, K. E. Comparison of rates of ratoon stunting disease (RSD) spread and increase in different cultivars and reliability of fine RSD detection methods. Abstracts of the Pathology and Molecular Workshop. South Africa. 1997.
6. Molina, G. C.; Dolores, L. M.; Tocino, P. L. Detection of ratoon stunting disease in sugarcane Philippines. *Journal of Crop Science*. Ab. 1998, vol. 23, no. 1, p. 35.
7. Davis, M. J.; Dean, J. L.; Miler, J. D. y Shine, J. M. Jr. A method to screen for resistance to ratoon stunting disease of sugarcane. *Sugarcane*, 1994, vol. 6, p. 9-16.
8. Pan, Y. B., Grishan, M. P., Burner, D. M. y Wei, Q. Detección of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* using tissue blot hybridization with a PCR-derived DNA probe. Abstracts of the Pathology and Molecular Workshop. South Africa. 1997.
9. Chagas, P. R. P y Tokeshi, H. Método alternativo do coloracao do xilema para avaliacao do indice do raquitismo do soqueira em cana-do acucar. *Brasil Azucareiro*, 1988, vol. 4, p. 16-24.
10. Chagas, P. R. P y Tokeshi, H. Staining by transpiration methods for diagnosis of ratoon stunting disease in sugarcane. *Current Trends Sugarcane Pathology*, 1994, p. 159-162.
11. Giglioti, E. A., Comstock, J. C, Grisham, M., Matsuoka, S., Tokeshi, H. A Comparison of staining by transpiration and tissue blot immunoassay to screen sugarcane genotypes for resistance to ratoon stunting disease. Abstracts of the Pathology and Molecular Workshop. South Africa. 1997.
12. Perdomo, R.; Powell, G y Wang, Z. *Journal of American Society of Sugarcane Technologists*, 1997, vol. 17.
13. Croft, B. J. y Greet, A. D. A simple method of rating sugarcane cultivars for resistance to ratoon stunting disease, 1997. Abstracts of the Pathology and Molecular Workshop. *South Africa*. 1997.
14. Fagan, M.; Grahah, G. C; Croft, B. J.; Henry, R. J.; Maclean, D. J.; Dietzgen, R. G.; Hayward, A. C; Teakle, D. S.; Henderson, J.; Whittle, P. J. L y Smith, G. R. PCR-ELISA: A new sensitive test for ratoon stunting disease. Abstracts of the Pathology and Molecular Workshop. South Africa. 1997.
15. Pan, Y. B, Grishan, M. P., Burner, D. M.; Daman, K. E. Jr. y Wei, Q. A polimerase chain reaction protocol for the detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* , the causal bacterium of sugarcane ratoon stunting disease. *Plant Dis*. 1998, vol. 82, p. 285-290.
16. Van Antwerpen, T. Development of a DNA-based diagnosis methods to detect sugarcane bacterial pathogens with emphasis on *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*. [Tesis de Maestría], University of Stellenbosch, 1999.
17. Iglesias, A.; Pérez Milián, J. R.; Matos, M.; Diaz, M.; Peralta, E. y Giglioti, A. Tinción de los haces funcionales (STM): una alternativa para la evaluación de la resistencia al RSD de la caña de azúcar. En: Resúmenes X Congreso de la Asociación Latinoamericana de Fitopatología y XXVI Congreso de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, Sept., 1999.
18. Imauti, M. T. y Tokeshi, H. Comparison between methods for diagnosis of ratoon stunting disease (*Clavibacter xily* subsp. *xily*): Staining by transpiration methods and observation of bacterium in contrast phase microscopy, alkaline induced metaxylem autofluorescence. *Current trends Sugarcane Pathology*, 1994, p. 173-184.
19. James, G. A review of ratoon stunting disease. *INT Sugar JNL*, 1996, vol.98, no. 1174, p. 532-541.
20. China, A. M.; Nass, H.; Doboín, C.; Dolores, M. Enfermedades y daños de la caña de azúcar en Latinoamérica, Barquisimeto. Impreso, 2000, 106 p.
21. Sigarroa, A. Biometría y diseño experimental. La Habana. Ed. Pueblo y Educación, 1985. 390 p.

Recibido: 19 de febrero del 2001

Aceptado: 13 de julio del 2001

DIPLOMADOS

Precio: 500 USD

Incremento en la producción de las áreas afectadas por la sequía

Coordinador: Dra.C. María C. González Cepero
Duración: 1 año

SOLICITAR INFORMACIÓN

Dr.C. Walfredo Torres de la Noval
Dirección de Educación, Servicios Informativos
y Relaciones Públicas
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)
Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,
La Habana, Cuba. CP 32700
Telef: (53) (64) 6-3773
Fax: (53) (64) 6-3867
E.mail: posgrado@inca.edu.cu

