



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO



DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

ETIOLOGÍA DE LA PUDRICIÓN CARBONOSA DE LA
CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum* L.) EN LA
REGIÓN DE PAPALOAPAN, VERACRUZ.

TESIS QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

PRESENTA:

VELÁZQUEZ MARTINEZ GUADALUPE DEL CARMEN



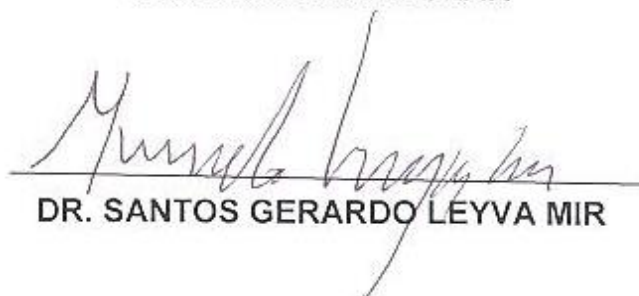
DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

Chapingo México, a 06 de Junio de 2014

La presente tesis titulada: "ETIOLOGÍA DE LA PUDRICIÓN CARBONOSA DE LA CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum* L.) EN LA REGIÓN DEL PAPALOAPAN, VERACRUZ", fue realizada por la C. Guadalupe del Carmen Velázquez Martínez, bajo la dirección y asesoría del consejo particular indicado; ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el título de "MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL".

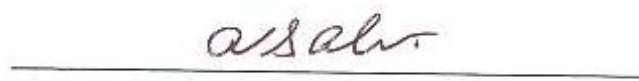
CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR



DR. SANTOS GERARDO LEYVA MIR

ASESOR



DR. OMAR GUADALUPE ALVARADO GÓMEZ

ASESOR



DR. ANDRÉS BOLAÑOS ESPINOZA

ETIOLOGÍA DE LA PUDRICIÓN CARBONOSA DE LA CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum* L.) EN LA REGIÓN DEL PAPALOAPAN, VERACRUZ.

Guadalupe del Carmen. **Velázquez- Martínez**.¹, Santos Gerardo **Leyva-Mir**¹, Omar Guadalupe **Alvarado-Gómez**², Andrés **Bolaños- Espinoza**¹

¹Protección Vegetal, Universidad Autónoma Chapingo Carretera México-Texcoco. Km. 38.5, Texcoco, Estado de México. ² Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Agronomía, Av. Universidad s/n Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León.

RESUMEN

El estudio tuvo como finalidad la identificación del agente causal de pudrición carbonosa en caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), en Veracruz, México. Se utilizaron varios métodos de identificación como caracterización morfológica, microscopia electrónica, PCR y la realización de los postulados de Koch. Con la finalidad de determinar la incidencia de la enfermedad se realizó una evaluación en diez variedades de caña de azúcar más prometedoras de INIFAP (MEX 03-47, SP 80-32, Q 28-2, ITV 92-1424, MEX 03-36, MEX 03-32, B 33-37, CP 2086, LAICA 82-2220 y MEX 03-50) para observar pudrición de raíz y así aislar el patógeno y comprobar el agente causal de la pudrición carbonosa de la caña de azúcar. Se realizaron montajes para observar las estructuras reproductivas del patógeno para tomar mediciones de los conidios. De acuerdo con la caracterización morfológica se logró aislar al hongo presente en el tallo al agente causal identificado como *Macrophomina phaseolina*, obtenido del medio de cultivo PDA siendo el primer reporte de este patógeno en caña de azúcar en México. Las secuencias de ADN asignadas por GenBank fueron: KJ577740 y KJ577741 de las muestras amplificadas por PCR del cultivo monosporicodió un 99% de coincidencia para *Macrophomina phaseolina* y con esto se comprobó el patógeno que causa la pudrición carbonosa.

Palabras clave: Pudrición carbonosa, enfermedad, variedades, banco de genes

ETIOLOGY OF CHARCOAL ROTTENNESS IN SUGARCANE (*Saccharum officinarum* L.) IN THE REGION OF PAPALOAPAN, VERACRUZ.

Guadalupe del Carmen **Velázquez- Martínez**¹, Santos Gerardo **Leyva-Mir**¹, Omar Guadalupe **Alvarado-Gómez**², Andrés **Bolaños- Espinoza**¹

¹Protección Vegetal, Universidad Autónoma Chapingo Carretera México- Texcoco. Km. 38.5, Texcoco, Estado de México. ² Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de Agronomía, Av. Universidad s/n Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L. CP66451

ABSTRACT

This study aimed to identify the causative agent of charcoal rottenness in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) in Veracruz, Mexico. Several methods of identification and morphological characterization, electronic microscopy, PCR and the realization of Koch's postulates were used. In order to determine the incidence of this disease, an evaluation was conducted in ten promising varieties of sugarcane promoted by the INIFAP (MEX 03-47, SP 80-32, Q 28-2, MOT 92-1424, MEX 03-36, MEX 03-2, B 33-37, CP 2086, LAICA 82-2220 and MEX 03-50) to observe the root rottenness, therefore re-isolate the pathogen and to confirm the causative agent of charcoal rot of sugarcane. Slide preparations were done to observe the reproductive structures of the pathogen and to take measurements of the conidia. According to the morphological characterization, the isolation of the fungi present in the stem of the sugarcane, *Macrophomina phaseolina* was successfully identified, and it was obtained from the media culture as the first report PDA of this pathogen in Sugarcane in Mexico. The DNA sequence from GenBank were assigned: KJ577740 and KJ577741 samples and amplified by PCR of monosporic culture gave a 99% of coincidence to *Macrophomina phaseolina*. Therefore, the pathogen causing charcoal rottenness was found.

Keywords: Charcoal rot, disease, varieties, GenBank

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la prestarme vida y llenarla de bendiciones y ayudarme a superar cada prueba que ha puesto en mi camino para permitirme llegar hasta estos momentos

A la universidad Autónoma Chapingo y al Departamento de Parasitología Agrícola por permitirme concluir con mis estudios profesionales.

Al **Dr. S. Gerardo Leyva Mir**, por su valiosa orientación y la dirección de la presente tesis

Al **Dr. Omar G. Alvarado Gómez** por el apoyo para la identificación del material utilizado en la presente tesis

Al **Dr. Andrés Bolaños Espinosa**, por las correcciones y aportaciones para la realización de la presente tesis.

A todos los profesores de la Maestría en Protección Vegetal que contribuyeron en mi formación académica.

A todos mis amigos y compañeros que de alguna forma hemos compartido buenos momentos.

DEDICATORIA

Con amor y respeto a las personas más importantes y que me dieron la vida.

Sr. José Alberto Velázquez Vargas y Sra. Corisandra Martínez Gumeta

Por su apoyo incondicional en cada una de las decisiones que he tomado ya que siempre me apoyan y palabras de aliento. Mil gracias, siempre los llevo en mis pensamientos.

A mis hermanos **Lorena, Diego, Andrea, Odeli y Odalis** por su apoyo incondicional y porque siempre poder contar con ustedes.

A mi novio **Antonio de Jesús Morales Vázquez**, te quiero, gracias por todo tu apoyo.

A mi abuela **Elvira** gracias por sus palabras de aliento y a mis abuelos **Ángel y Raquel** que aunque ya no estén con nosotros, gracias por todo el apoyo que me brindaron

A mis tíos **Humberto, Sonia, Josefa** gracias por apoyarme siempre.

A mis primos **Miriam, Brenda, Alcira, Blanca, Lourdes, Gerardo, Ulises, Yesenia**.

A mis amigos: **Jess, Mary, Edith, Yolanda, Marlen, Lorena, Noemí, Juan Alberto, Juanito y Silvana**, siempre serán personas importantes en mi vida y gracias por todo el apoyo.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	I-III
ÍNDICE DE CUADROS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
1. INTRODUCCIÓN.....	1-2
2. OBJETIVOS.....	2
3. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
3.1. Origen	3
3.2. Taxonomía.....	4
3.3. <i>Saccharum officinarum</i>	4
3.4. Importancia de la caña de azúcar en el mundo.....	5
3.5. Importancia de la caña de azúcar en México.....	6
3.6. Importancia de la caña de azúcar en Veracruz.....	7
3.7. Subproductos de la caña de azúcar	8
3.8. Enfermedades fungosas de la caña de azúcar en México.....	9
3.8.1. Muermo rojo(<i>Physalospora tucumanensis</i>).....	9
3.8.1.1. Organismo causal.....	9
3.8.1.2. Historia.....	9
3.8.1.3. Síntomas.....	10
3.8.1.4. Fuente de inóculo.....	10
3.8.1.5. Medidas de control.....	11
3.8.2. Pokkahboeng (<i>Fusarium moniliforme</i>).....	11
3.8.2.1. Organismo causal.....	11
3.8.2.2. Historia.....	11
3.8.2.3. Síntomas.....	11
3.8.2.4. Fuente de inóculo.....	12
3.8.2.5. Medidas de control.....	12
3.8.3. Roya café(<i>Puccinia melancephala</i>).....	12
3.8.3.1. Organismo causal.....	12
3.8.3.2. Historia.....	12
3.8.3.3. Síntomas.....	13
3.8.3.4. Fuente de inóculo.....	13
3.8.3.5. Medidas de control.....	13

3.8.4. Carbón(<i>Ustilago scitaminea</i>).....	14
3.8.4.1. Organismo causal.....	14
3.8.4.2. Historia.....	14
3.8.4.3. Síntomas.....	14
3.8.4.4. Fuente de inóculo.....	14
3.8.4.5. Medidas de control.....	15
3.8.5. Hongo en estudio <i>Macrophomina phaseolina</i>	15
3.8.5.1. Clasificación taxonómica.....	15
3.8.5.2. Agente causal.....	16
3.8.5.3. Ciclo biológico.....	16
3.8.5.4. Sintomatología.....	16
3.8.5.5. Importancia.....	17
3.8.5.6. Métodos de control.....	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
4.1. Colecta de plantas enfermas.....	18
4.2. Aislamiento del patógeno.....	18
4.3. Purificación de la cepa del hongo.....	19
4.4. Incremento del inóculo.....	19
4.5. Identificación morfológica del patógeno.....	19
4.6. Identificación molecular.....	20
4.6.1. Extracción de ADN.....	20
4.6.2. Prueba de PCR.....	21
4.6.3. Secuenciación.....	21
4.7. Pruebas de patogenicidad e inoculación en invernadero.....	22
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
5.1. Aislamiento del patógeno.....	24
5.2. Postulados de Koch.....	24
5.3. Identificación del patógeno.....	27
5.3.1. Características del hongo.....	27
5.3.2. Identificación por PCR.....	29
5.3.3. Secuenciación.....	29
5.3.4. Prueba de patogenicidad.....	30
6. CONCLUSIONES.....	31
7. BIBLIOGRAFÍA.....	32-36

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales estados productores de caña de azúcar en México.....	6
Cuadro 2. Resultados de la prueba de patogenicidad.....	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción mundial de caña de azúcar en 2011.....	6
Figura 2. Estados productores de caña de azúcar en México.....	7
Figura 3. Subproductos obtenidos de la caña de azúcar.....	9
Figura 4. Zonas cañeras en el estado de Veracruz.....	18
Figura 5. Medio de cultivo PDA con la colonia aislada.....	24
Figura 6. Variedad LAICA 82-2220; a) Testigo, b) Planta inoculada con el patógeno, c) Tallo de caña con micelio del patógeno y d) Conidios obtenidos de la planta inoculada.....	25
Figura 7. Variedad MEX 03-47; a) Testigo, b) Planta inoculada con el patógeno, c) Tallo de caña con micelio del patógeno y d) Conidios obtenidos de la la planta inoculada.....	26
Figura 8. Características del hongo; a) Picnidio de <i>M. phaseolina</i> en microscopio compuesto, b) Micrografía de picnidio de <i>M. phaseolina</i> , c) Micrografía de los conidios de <i>M. phaseolina</i> y d) Picnidio obtenido de tejido vegetal de caña de azúcar.....	27
Figura 9. Micrografías de las mediciones de los conidios pertenecientes a <i>M. phaseolina</i>	28
Figura 10. Ampliación por PCR a partir de ADN's aislados de micelio de hongos de caña de azúcar: Carriles 1 al 4 son productos de 4 aislamientos. Carril 5 control positivo. M es el marcador de peso molecular ladder-100 de Axygen Biosciences.....	29

INTRODUCCIÓN

Más del 50% del consumo mundial de azúcar se obtiene de la caña de azúcar que crece en climas tropicales y subtropicales, el resto procede de la remolacha azucarera, que crece en regiones templadas. La caña de azúcar se cultiva en más de 130 países en el mundo; Brasil aporta el 43%, India el 20% de la producción seguidos por China, Tailandia, Pakistán y México (FAO, 2011).

El azúcar es un producto de consumo básico para la población mexicana, es uno de los cinco productos básicos alimenticios junto con maíz, frijol, trigo y café. Destaca en el consumo del ámbito industrial la industria refresquera, galletera, alcoholera, dulcera y la de alimentos balanceados para alimentación. La caña de azúcar se produce en diversos climas y suelos en 15 entidades federativas del país (SAGARPA, 2011).

El cultivo se sitúa entre los 37° de latitud norte y los 31° de latitud sur. Se encuentra en las costas del Océano Pacífico y del Golfo de México, en el sur de Quintana Roo y comprende una faja transversal sobre el paralelo de los 19° de latitud norte. Además señalan que el cultivo se desarrolla en un amplio margen de condiciones de humedad, se encuentran en zonas con precipitación pluvial de 10 000 mm anuales hasta zonas que experimentan extrema sequía, nortes se presentan en la época de zafra en la costa del Golfo de México, huracanes y ciclones hacen acto de presencia tanto en la costa del Golfo de México como en la costa del Océano Pacífico (Valdez *et al*, 2000).

En México, la caña de azúcar se cultiva en 774,243 ha las cuales producen 878,624 t con un rendimiento promedio nacional de 69.67 t/ha. En el estado de Veracruz se cultivan 280, 509 ha con un rendimiento de 69.67 t/ha (SIAP, 2011).

Las plagas y enfermedades de la caña de azúcar constituyen uno de los principales factores negativos para la producción de azúcar a nivel mundial. En las últimas décadas, el número de organismos patógenos y agentes etiológicos detectados sobre este cultivo ha crecido considerablemente y se han extendido de forma notable. Por ejemplo, hoy en día se conoce un inventario de 125 enfermedades en los 109 países y regiones cañeras, donde se produce aproximadamente el 60% del azúcar que se consume en todo el mundo. En cuanto a las enfermedades, las que mayor importancia tienen en nuestro país, son el mosaico común (Sugarcane Mosaic Virus), el Carbón de la caña de azúcar (*Ustilago scitaminea* Sydow) y la Roya común (*Puccinia melanocephala* Sydow), Pokka Boeng (*Fusarium moniliforme* Sheldon) entre otras (INIFAP, 2012).

Actualmente se ha observado una enfermedad en caña de azúcar en el estado de Veracruz cuya sintomatología se presenta como lesiones negras y posteriormente manchas extensas de color gris blanquecino, en donde se localizan las estructuras reproductivos del patógeno (esclerocios y picnidios) como se desconocía el agente causal fue necesario realizar un diagnóstico adecuado y concluir con la etiología de la enfermedad, además de llevar a cabo la evaluación de materiales en invernadero. Por lo anterior el presente trabajo tuvo como objetivo identificar al agente causal de la pudrición carbonosa en caña de azúcar, así como evaluar la incidencia del patógeno en diferentes variedades de caña de azúcar.

2.OBJETIVOS

- Identificar el agente causal de la pudrición carbonosa en plantas de caña de azúcar en Papaloapan, Veracruz.
- Evaluar la incidencia del patógeno en las variedades comerciales de caña de azúcar.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Origen

No se conoce con exactitud el origen de la caña de azúcar; se han propuesto muchas teorías al respecto, sin embargo, se considera que el centro de origen del complejo **Saccharum** es la región que comprende parte de la India, China, Nueva Guinea y zonas aledañas, por encontrarse ahí el mayor número de especies (Subirós, 1995).

La especie **Saccharum officinarum** fue importante en la dieta de las civilizaciones primitivas, alrededor de 3000 años A.C., ya era empleada para ser mascada y para ingerir su jugo. La referencia más antigua que existe del azúcares del siglo IV A.C. en Persia, donde se usaba con fines medicinales; además, se valoraba como artículo de lujo, por lo que era vendido a elevados precios (Subirós, 1995).

La India es considerada como el primer centro de explotación comercial de la caña, donde se hizo azúcar (Subirós, 1995).

Cristóbal Colon, en el segundo viaje realizado a América, en 1493, introdujo la caña en la isla La Española, que hoy es República Dominicana y Haití. El clon introducido fue Creola, presumiblemente un híbrido entre *S. barberi* y *S. officinarum*. De esta isla se difundió hacia Cuba, Puerto Rico, México, Colombia, Perú y a otros países del continente (Subirós, 1995).

Su expansión por el territorio mexicano puede explicarse no solo por haber encontrado condiciones favorables de clima, suelo y ambiente en general, si no por un sostenido incremento en la demanda por parte de los colonos, que alentó sustancialmente el crecimiento de la producción (Ochoa, 1991).

3.2. Taxonomía

De acuerdo a Daniels y Roach (1987) citado por Flores1991, la clasificación de la caña de azúcar es la siguiente:

Reino: Vegetal

División: Espermatofitas o fanerógamas

Sub-división: Angiospermae

Clase: Monocotiledóneas

Orden: Glumiflorae

Familia: Gramínea

Tribu: Andropogonae

Sub-tribu: Saccharae

Género: *Saccharum*

Especie: *officinarum*

El género *Saccharum* corresponde a un complejo constituido por seis especies; cuatro domesticadas (*S. officinarum*, *S. edule*, *S. barberi* y *S. sinensis*) y dos silvestres (*S. spontaneum* y *S. robustum*) (Daniels y Roach, 1987).

3.3. *Saccharum officinarum*

Esta especie es originaria de Nueva Guinea, de donde se extendió a Indonesia, India y otros lugares. Es conocida como la caña “noble”. Se caracteriza por su alto contenido de sacarosa, tallos gruesos y pesados, con bajo contenido de fibra y altura media. Los entrenudos son cortos, en forma de barril, generalmente coloreados (rosado, rojo, amarillo, púrpura, verde, entre otros); las hojas son anchas y se desprenden con facilidad. Son exigentes en clima y suelo; también son muy susceptibles a enfermedades (Subirós, 1995).

3.4. Importancia de la caña de azúcar en el mundo

Uno de los productos más consumidos a nivel mundial es el azúcar, ya sea que éste sea de la caña de azúcar o de la remolacha azucarera. Sin embargo, para muchos países de Latinoamérica, entre ellos México, y de Asia, el azúcar que se obtiene a partir de la caña de azúcar juega un papel importante como fuente de empleo y generación de ingresos para un amplio grupo de la población (Ochoa, 1991).

Según los pronósticos de la FAO, en 2011/12 la producción mundial de azúcar podría aumentar en cerca de 8 millones de toneladas, o sea un 4.6 por ciento, con respecto a 2010/11. Por segundo año consecutivo se prevé que la producción superará el consumo, y quedará un excedente en torno a los 5.4 millones de toneladas que contribuirá a reponer los niveles relativamente bajos de las existencias. El aumento de la producción azucarera se atribuye a una importante expansión de la superficie y de la utilización de insumos, favorecida por la firmeza de los precios internacionales del azúcar durante los dos últimos años y el retorno a características meteorológicas más normales.

El cultivo no puede darse en cualquier país si no que es de un clima tropical o subtropical, de ahí que la mayoría de los principales países productores se encuentren en Asia y América Central y del Sur y unas cuantas regiones de Europa.

De acuerdo a FAO, aproximadamente el 65% de la superficie cultivada con caña de azúcar se encuentra en seis países: Brasil, India, China, Tailandia, Pakistán y México como se puede observar en la Figura 1.

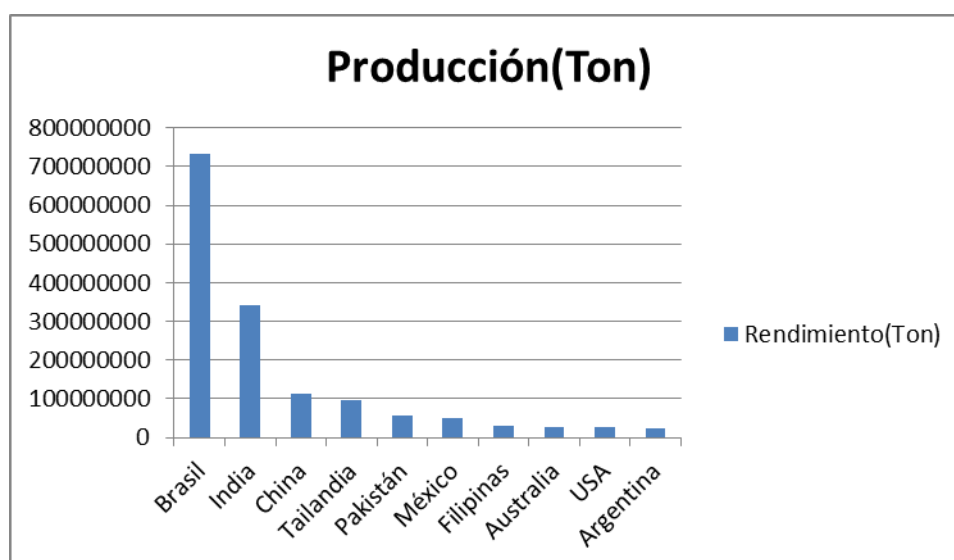


Fig. 1. Producción mundial de caña de azúcar en 2011 Fuente: FAO, 2011

3.5. Importancia de la caña de azúcar en México

En México la industria azucarera es históricamente una de las más importantes, debido a su relevancia económica y social en el campo; genera más de dos millones de empleos, tanto de forma directa como indirecta; se desarrolla en 15 entidades federativas (Fig. 2) y 227 municipios, generan un valor de producción primaria de alrededor de 30 mil millones de pesos (SAGARPA, 2011)

Cuadro 1. Principales estados productores y su participación en la producción nacional (SIAP, 2011).

Estado	Superficie cosechada(Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)
Chiapas	31 564 .00	2 779 064.60	88.04
Jalisco	65 256 .93	5 558 114.83	85.17
Nayarit	33 162. 08	2 694 490.87	81.21
Oaxaca	60 418. 30	3 376 314.36	55.88
SLP	60 323.00	3 556 109.50	58.95
Tamaulipas	54 888.00	3 551 343.00	64.70
Veracruz	268 586.15	17 371 561.56	64.68
Nacional	713 824. 00	49 735 273.26	69.67

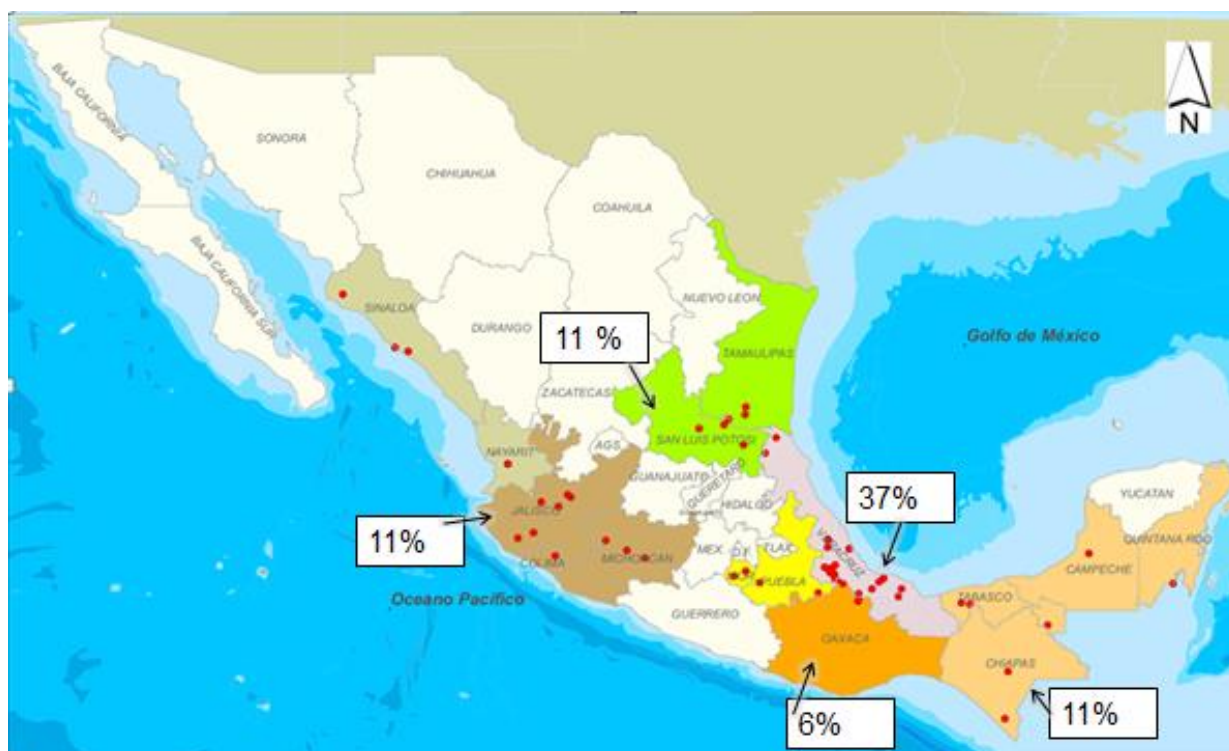


Fig. 2. Estados productores de caña en México Fuente: (SIAP, 2011).

3.6. Importancia de la caña en Veracruz

La caña de azúcar constituye el principal cultivo perenne en el estado de Veracruz. Otros cultivos destacados de esta índole en la entidad federativa son el café, naranja, mango, sandía, chile verde, papaya y la piña. La caña de azúcar se encuentra establecida en municipios del estado, los que participan con los mayores aportes de superficie: Atzacan, Martínez de la Torre, Misantla, Nautla, San Rafael, Tecolutla, Tlapacoyan y Vega de Alatorre. Cuenta con más de 268 586 hectareas sembradas y cosechadas, con el rendimiento promedio en campo fue de 64.8 ton/ha. En Veracruz la caña se industrializa en 22 ingenios (SIAP, 2011)

3.7. Subproductos de la caña de azúcar

La caña de azúcar se utiliza preferentemente para la producción de azúcar y se puede utilizar como fuente de materias primas para una amplia gama de derivados, algunos de los cuales constituyen alternativas de sustitución de otros productos con impacto ecológico adverso (cemento, papel obtenido a partir de pulpa de madera)(Fig.3). Los subproductos de esta industria, especialmente los mostos de las destilerías contienen una gran cantidad de nutrientes orgánicos e inorgánicos que permiten su reciclaje en forma de abono, alimento animal, etc. En este sentido es importante señalar el empleo de la cachaza como fertilizante, las mieles y los jugos del proceso de producción de azúcar pueden emplearse para la producción de alcohol, lo que permite disponer de un combustible líquido de forma renovable y la incorporación de los derivados tradicionales (tableros aglomerados, papel y cartón, cultivos alternativos para alimento animal y mieles finales). Una pequeña parte la producción de caña de azúcar tiene fines de producción de piloncillo, también es conocido como panela. El piloncillo tiene varios usos, como materia prima en la industria de la repostería, pastelería, y como endulzante en diversos alimentos y también se usa para la elaboración de alcohol y otros licores. Otra cantidad de caña aún más pequeña se utiliza como fruta de estación, aunque se vende todo el año, se concentra en la temporada navideña para las piñatas y el tradicional ponche (SIAP, 2011).

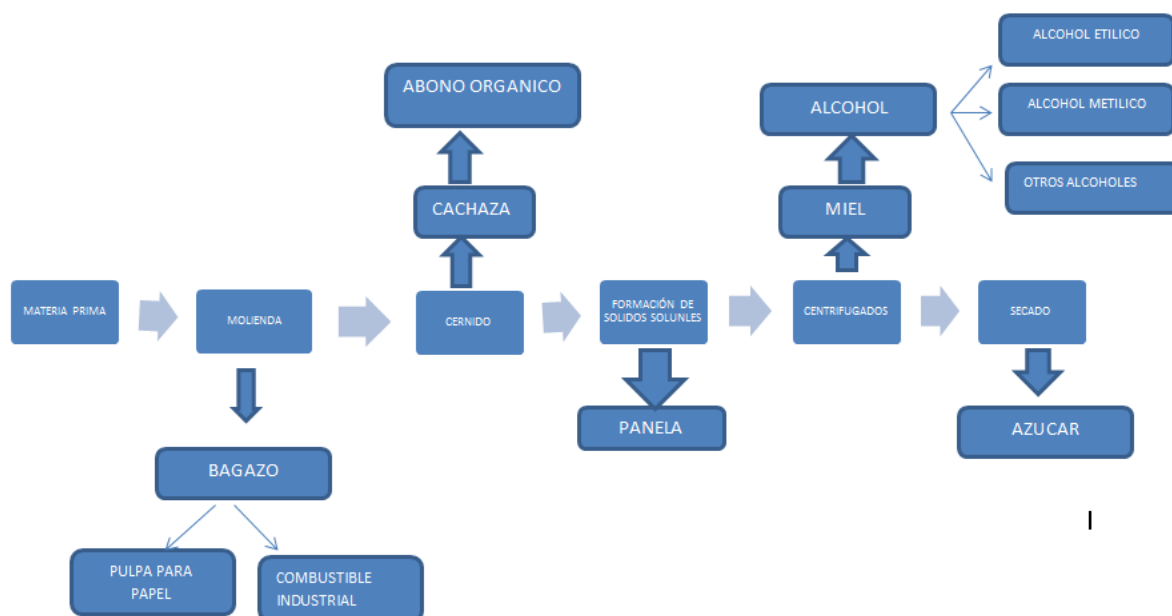


Fig. 3. Subproductos obtenidos de la caña de azúcar FUENTE (SIAP, 2011)

3.8. Enfermedades fungosas de la caña de azúcar en México

Debido a la importancia que revisten los hongos, como causantes de las enfermedades de la caña de azúcar a continuación se da una breve descripción de los más importantes.

3.8.1. Muermo rojo o pudrición roja (*Physalospora tucumanensis*)

3.8.1.1. Organismo causal

Colletotrichum falcatum Went, estado imperfecto. *Physalospora tucumanensis* Speg., estado imperfecto (Agnihotri, 1990).

3.8.1.2. Historia

La pudrición roja del tallo conocida también con el nombre de muermo rojo de la caña es una de las enfermedades más antiguas que se conocen y se presenta en la mayoría de los países que cultivan caña de azúcar. Esta enfermedad fue considerada de importancia económica y causó el fracaso de algunas variedades comerciales importantes en varios países, principalmente en Estados Unidos de Norteamérica y la India.

3.8.1.3. Síntomas

Puede atacar cualquier parte de la planta, pero principalmente a los tallos y a los trozos de semilla. La enfermedad en los tejidos del tallo presenta un color rojizo, con algunas manchas blancas de forma alargada en los ángulos a la derecha del axis del tallo. Estas manchas blancas son específicas de la pudrición roja y varían en tamaño y cantidad. Las variedades susceptibles pueden mostrar un color rojizo a lo largo del tallo y pueden desarrollar cavidades longitudinales que contienen micelio. Además señala que las lesiones que se producen en la nervadura de las hojas comienzan por pequeñas manchas rojas alargadas y toman un color pajizo, a menudo se extienden a lo largo de toda la nervadura de la hoja. Las pequeñas manchas negras sobre las lesiones son los cuerpos fructíferos de los patógenos (Agnihotri, 1990).

3.8.1.4. Fuentes de inóculo

Lesiones en las nervaduras, tallos enfermos, trozos de caña infectados y desechos de la cosecha. Los conidios producidos en las lesiones de la nervadura de las hojas y de los tallos son la mayor fuente de inóculo durante el periodo de crecimiento. Estos son diseminados por el viento, la lluvia o el rocío en la cepa de la caña y a otros tallos o en la caña joven adyacente. La infección se presenta principalmente en el área del nudo, la yema, la raíz primordial, la vaina de las hojas, la escama de la yema o a través de las grietas o lesiones en los tallos (Súbiros, 1995).

Las condiciones ambientales tienen un gran efecto sobre el grado de infección y en las pérdidas que ocasiona; pueden ser por el deterioro de los trozos de la caña semilla y de las socas, la muerte de tallos o planta individuales, la reducción del contenido de sacarosa, la pureza del jugo y problemas durante el procesamiento. Se han reportado pérdidas en algunos países que se han extendido hasta la pérdida completa de la cosecha (Súbiros, 1995).

3.8.1.5. Medidas de control

Las buenas prácticas de cultivo e higiene del campo son importantes para el control de la enfermedad. La buena preparación de la cama de siembra, el uso de semilla de caña de buena calidad, la siembra en época de calor en lugar de frío, buen drenaje, humedad adecuada del riego y la destrucción de los residuos de cosecha pueden ayudar(Súbiros,1995).

3.8.2. Pokkah boeng (*Fusarium moniliforme*)

3.8.2.1. Organismo causal

Fusarium moniliforme Shedon, estado imperfecto, *Giberella fijiikuroi* (Sawada) Wollen., estado perfecto (Sheldon, 1904).

3.8.2.2. Historia

El pokkah boeng es un término javanes que denota un cogollo mal formado o retorcido. La enfermedad fue originalmente descrita por Wakker y Went en Java en 1896, pero no fue establecido ningún agente causal. Bolle en 1927 fue el primero en demostrar que la enfermedad es causada por un hongo, *Fusarium moniliforme*. La enfermedad ha sido registrada en casi todos los países donde se cultiva la caña de azúcar.

3.8.2.3. Síntomas

Los síntomas del pokkah boeng son el desarrollo de una condición clorótica hacia la base de las hojas jóvenes, acompañado por una deformación de las hojas afectadas, deformación del tallo con lesiones externas e internas y en casos agudos la muerte del tallo (pudrición del cogollo). En el campo se presentan muchas variaciones de los síntomas generales, pero el resultado final es usualmente una copa y tallo defectuosos o dañados (Martin et al.,1961).

La base de las hojas afectadas es a menudo más angosta que las hojas normales. Cuando las hojas maduran se desarrollan rayas rojizas de forma irregular y manchitas dentro de las partes cloróticas y algunas veces también en porciones verdes de las secciones inferiores de la hoja. Las áreas rojizas

algunas veces se desarrollan en perforaciones que no tienen un arreglo definido, o en forma de lesiones escalonadas. El tejido a lo largo de los márgenes y puntas de las hojas pueden llegar a ser de un color rojo cafésoso a negro. Las vainas afectadas por la enfermedad se vuelven cloróticas y desarrollan áreas necróticas irregulares de un color rojizo, similares aquellos de las hojas(Martin *et al.*,1961).

.

La infección de la hoja algunas veces continúa hacia abajo y penetra el tallo a través del punto de crecimiento y rayas rojizas oscuras pueden extenderse a través de varios entrenudos. El estado más avanzado y serio del pokkah boeng es la pudrición del cogollo; la espiga joven y la copa entera de la planta mueren(Martin *et al.*,1961).

.

3.8.2.4. Fuente de inóculo

La transmisión de la enfermedad es principalmente por el movimiento de las esporas de un lugar a otro por las corrientes de aire. La transmisión por trozos de semilla tomadas de plantas enfermas puede ocurrir ocasionalmente, pero tiene poca importancia económica (Súbiros, 1995).

3.8.2.5. Medidas de control

El control más satisfactorio del pokkah boeng es el uso de variedades resistentes y la aplicación de fungicidas como Bavistin y/o Oxícloruro de cobre (Patil *et al.*, 2007).

3.8.3. Roya café (*Puccinia melanocephala*)

3.8.3.1. Organismo causal

El hongo causante de la roya pertenece al grupo de los chahuixtles que atacan a las gramíneas como el trigo, el maíz y los pastos (Súbiros,1995).

3.8.3.2. Historia

En México fue localizada en 19179 en Cárdenas, Tabasco, en la variedad B 4362 y se supone que el inóculo llegó acarreado por los vientos. Poco después apareció en todos los ingenios de la Cuenca del Papaloapan. El hongo se propagó rápidamente en los cañaverales ubicados a lo largo de la vertiente del

Golfo de México, donde encontró condiciones favorables para su desarrollo (Huerta *et al*, 1979).

3.8.3.3. Síntomas

Los síntomas de la roya común son pequeñas manchas amarillentas alargadas, visibles por los dos lados de la hoja. Estas manchas se agrandan sobre todo alargándose, y se vuelven amarillo- rojizas o pardas. Un pequeño halo, de color amarillo-verdoso pálido se forma alrededor de las lesiones. En las variedades sensibles estas lesiones toman rápidamente una apariencia pustulosa, principalmente en el envés de las hojas. Aparecen con más frecuencia hacia la extremidad de las hojas y se abren muy pronto, liberando masas densas de esporas de color entre naranja y pardo (Flores, 1997).

Pueden aparecer numerosas lesiones sobre la hoja individualmente, confiriéndole una apariencia parda o herrumbrosa. Las plantas afectadas toman una coloración característica, yendo del color oxidado al pardo, dependiendo de la variedad, y esta coloración es visible incluso desde lejos. La roya es más severa en las cañas de seis meses de edad, en planta común en retoños y se disemina generalmente con la edad aunque no en todas las variedades explotadas. Las regiones y estaciones templadas favorecen también la roya (Flores, 1997).

3.8.3.4. Fuentes de inóculo

El patógeno es diseminado principalmente por el viento, y en menor cantidad por el agua de lluvia(Súbiros, 1995).

3.8.3.5. Medidas de control

La única medida eficaz para controlar la roya común es el empleo de variedades resistentes. Los fungicidas son ineficaces, ya que hay que proteger constantemente las hojas nuevas y teniendo en cuenta que la caña crece durante todo el año, resultan extremadamente costosos (Victoria *et al.*, 2007)

3.8.4. Carbón (*Ustilago scitaminea*)

3.8.4.1. Agente causal

Ustilago scitaminea

3.8.4.2. Historia

Descubierto en 1980, en la zona del ingenio Álvaro Obregón, Quintana Roo, en la variedad Méx 56-18; se supone que la infección provino de Corozal, Belice, donde la enfermedad se conocía desde 1978 (Flores, 1980).

3.8.4.3. Síntomas

La característica de la enfermedad es la formación de una vara como látigo que nace del cogollo y puede medir de 2-3 cm de diámetro, por 10 hasta 120 cm de longitud y que encierra millones de esporas (Ferreira y Comstock, 1989). Los autores indican que la infección tiene lugar después que las esporas llevadas por el viento caen sobre los brotes expuestos y penetran bajo las escamas de las yemas. Incluso antes de la aparición del látigo, los tallos infectados crecen delgados con apariencia de zacate. Las yemas laterales pueden igualmente ser infectadas y producen látigos. En las variedades susceptibles, la infección precoz produce tallos herbáceos y el amacollamiento aumenta de dos a tres veces. Después de la germinación de las teliosporas, los esporidios o basidiosporas pueden ser unicelulares como las levaduras o filamentosas como un micelio (Ferreira y Comstock, 1989).

3.8.4.4. Fuentes de inóculo

La dispersión de las esporas se da por el viento, las cuales al llegar a las hojas de la caña son arrastradas por el rocío o la lluvia hasta las yemas, que es por donde penetra el micelio, esta es la forma más natural y efectiva. El transporte de las esporas en los residuos de cosecha, procedentes de campos infectados por los vehículos, los animales, maquinaria e implementos de labranza (Súbiros, 1995).

3.8.4.5. Medidas de control

Para un efectivo control de esta enfermedad es necesario seguir las siguientes indicaciones: (a) la siembra de variedades resistentes.; (b) selección de semilleros sanos; (c) en plantaciones con presencia de la enfermedad, realice la “entresaca” de plantas enfermas y “látigos” para su posterior quema en las afueras de la parcela; y (d) control de malezas y limpieza de carriles, especialmente zacates y otras gramíneas, pues sirven de hospederas del hongo causante de la enfermedad (INIFAP, 2012).

3.8.5. Hongo en estudio (*Macrophomina phaseolina*)

El hongo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidataca a más de 500 especies de plantas y cerca de 100 familias (Mihail y Taylor, 1995). El gran número de hospederos sugiere que es un hongo altamente variable en patogenicidad (Dhingra y Sinclair, 1978). Los mismos autores indican que *M. phaseolina* causa la pudrición carbonosa en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y otros cultivos de importancia económica como soya [*Glycinemax* (L.) Merr], sorgo [*Sorghumbicolor* (L.) Moench], maíz (*Zea mays* L.), ajonjolí (*Sesamumindicum* L.) y girasol (*Helianthus annuus* L.). Los daños que se reportan por pudrición carbonosa son variables y generalmente fluctúan entre el 10 y 60% en pérdidas del rendimiento de grano, así como incidencias de hasta del 100% en países como Estados Unidos de América, México, Venezuela y Brasil (Abawi y Pastor-Corrales, 1990).

En México el hongo se ha detectado en regiones áridas, subtropicales y tropicales (Mayek- Perez *et al.*, 2001).

3.8.5.1. Clasificación taxonómica (Wheeler, 1975)

División Eumycota

Subdivision Deuteromycotina

Clase Coelomycetes

Orden Sphaeropsidales

Familia Sphaeropsidaceae

Genero *Macrophomina*

Especie *phaseolina*

3.8.5.2. Agente causal

El hongo imperfecto *M. phaseolina* presenta una fase esclerocial (miceliasterilia) denominada *Rhizoctonia bataticola* (Taub) Butler y una fase picnidial (Sphaeropsidal) denominada *M. phaseolina* (Dhingra y Sinclair, 1978). El hongo presenta micelio ramificado con hifas hialinas, filiformes y septadas; mismas que pueden tener ramificaciones secundarias. Los conidios del hongo son fusiformes, unicelulares, levemente curvos, puntiagudos en un extremo y redondeados en otro. Como estructuras de resistencia, *M. phaseolina* produce microesclerocios que son esféricos o ligeramente alargados, rodeados de micelio cuyas prolongaciones contribuyen a su formación. Los microesclerocios son articulados, duros, coraloideos y de color negro (Abawi y Pastor- Corrales, 1990).

3.8.5.3. Ciclo biológico

La pudrición carbonosa es favorecida por el déficit hídrico y altas temperaturas (Abawi y Pastor- Corrales, 1990) *M. phaaseolina* existe en el suelo como una masa compacta de micelio endurecido llamadas esclerocios que pueden permanecer latentes durante muchos años. Bajo condiciones apropiadas, las hifas germinan a partir de esclerocios, penetrando a las raíces en la pared celular de plantas hospederas. Curiosamente *M. phaseolina* se ve favorecida por las condiciones de altas temperaturas, y el hongo puede crecer rápidamente en el tallo y se multiplica en el hospedero cuando las plantas se estresan en los veranos calurosos y secos (Olaya y Abawi, 1996).

3.8.5.4. Sintomatología

En frijol causa lesiones negras e irregulares, hundidas y cercana a la base de los cotiledones, mismas que pueden llegar a cubrirlos por completo, extendiéndose en el tallo, y a menudo, envolviendo los peciolo de las hojas, lo que causa estrangulamiento del tallo y la muerte de la plántula (Abawi y Pastor, 1990). En planta adulta, el hongo causa secamiento al invadir los vasos del xilema. La raíz presenta coloración de rojo a café y se produce micelio que va de gris a negro; además, se producen microesclerocios de color negro. El tallo

presenta poca o nula turgencia al secarse las plantas adquiriendo un color pajizo. Las plantas infectadas mueren sin producir semilla o sufren achaparramiento y reducen su rendimiento (Dhingra y Sinclair, 1978)

En soya las plantas enfermas pueden marchitarse y morir prematuramente con hojas senescentes además del desprendimiento de los tejidos corticales de la parte inferior del tallo y la raíz principal y el aspecto gris moteado en estos tejidos, así como la formación de microesclerocios (Bressano *et al*, 2010).

En girasol el patógeno generalmente afecta el sistema fibrovascular de las raíces y entrenudos basales ,el marchitamiento progresivo, la pérdida de vigor y rendimiento, después de la floración ahuecamiento del tallo y la presencia de microesclerocios negros puede ser tan numerosos como para dar un aspecto negro grisáceo al tejido(Salik, 2007).

3.8.5.5. Importancia y daños

M. phaseolina es un grave problema en soya causando pérdidas en rendimiento en Argentina, Brasil, Canadá, Paraguay y los Estados Unidos durante 1994 de 1.23 millones de toneladas, valoradas en 272.260.000 dólares. Sólo en los Estados Unidos, la pérdida de rendimiento atribuibles a la pudrición carbonosa en 1994 fue de 0.28 millones de toneladas, con un valor de 60.650.000 dólares (Wratheret *al*, 1998).

3.8.5.6. Métodos de control

El control de la pudrición carbonosa incluye: la rotación de cultivos, la eliminación del material vegetal después de la cosecha, la manipulación de las fechas de siembra, fertilización adecuada y oportuna, la densidad de siembra y el riego según sea necesario. Otras estrategias, como la aplicación de fungicidas a las semillas y el suelo o el uso de agentes de control biológico también se han empleado. Sin embargo, estas estrategias hasta la fecha no han facilitado el control efectivo del patógeno y con frecuencia son difíciles de aplicar, debido a los altos costos. Por lo tanto, la opción más viable para controlar el patógeno es desarrollar germoplasma resistente (Abawi y Pastor-Corrales, 1986).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Colecta de plantas enfermas

La colecta del material enfermo se realizó en lotes de plantas obtenidas del Ingenio Cosamaloapan en la región del Papaloapan, en el estado de Veracruz (Fig. 4.) Las plantas seleccionadas mostraban síntomas de pudrición de tallo y raíz, así como la presencia de microesclerocios de color negro. Las plantas afectadas fueron etiquetadas, colocadas en bolsas de polietileno para su transporte al laboratorio de Micología del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo para realizar la identificación del agente causal.



Fig. 4. Zonas cañeras en el estado de Veracruz FUENTE: (SAGARPA, 2013)

4.2. Aislamiento del patógeno

El material colectado se lavó con agua corriente y posteriormente se seccionó el tejido que presentaba síntomas de la enfermedad con una navaja en trocitos pequeños los cuales fueron desinfectados en una solución de hipoclorito de sodio al 1% por espacio de 1 a 5 minutos, enjuagados con agua destilada estéril y secados con papel filtro, finalmente se transfirió el tejido infectado a cajas Petri distribuyéndose en toda la caja con medio de cultivo PDA, se etiquetó la caja y se dejó crecer a temperatura ambiente por tiempo indefinido hasta que se observó el crecimiento micelial.

4.3. Purificación de la cepa del hongo

Cuando se observó el desarrollo del micelio del hongo se transfirieron trozos a otras cajas Petri con PDA. Se dejó desarrollar el hongo por una semana, transfiriéndolo nuevamente a cajas Petri con PDA para obtener un cultivo puro.

El hongo desarrollado abundantemente fue transferido a tubos con PDA para posteriores estudios y conservados en aceite mineral.

4.4. Incremento del inóculo

Una vez que el hongo creció se procedió a incrementarlo en cajas Petri con el medio de cultivo PDA, a fin de obtener una gran cantidad de inóculo para la prueba de patogenicidad.

4.5. Identificación morfológica del patógeno

Para la identificación del patógeno se hicieron preparaciones para observar sus estructuras al microscopio compuesto, esto se realizó utilizando portaobjetos y cubreobjetos convencionales, siendo el medio de montaje con lactofenol. Las características que se determinaron fueron el tipo de micelio, estructura reproductiva, tamaño, forma, color de los conidios.

Para la determinación del tamaño de los conidios se procedió a la medición de 100 de ellos, utilizando el microscopio previamente calibrado, las medidas que se tomaron fueron: largo y ancho. El medio de cultivo utilizado para la identificación fue PDA.

4.6. Identificación molecular

4.6.1. Extracción de ADN

Las cepas utilizadas para llevar a cabo la extracción de ADN, fueron derivadas del reaislamiento que se hizo en las pruebas de patogenicidad, mismas que fueron transferidas a medio de cultivo PDA.

A los 15 días de cultivo en AN, se muestrearon aproximadamente 100 mg de micelio con una asa bacteriológica, y se transfirieron a un tubo de centrifuga de 1.5 ml. Se realizó una extracción de ADN de cada muestra utilizando el kit AxyPrep Multisource Genomic Miniprep^{MR} (AxygenBiosciences) siguiendo el procedimiento de la compañía con ligeras modificaciones: A 100 mg de micelio se adicionaron 350 µL de buffer PBS y 0.9 µL de RNasa A. Se homogenizó la mezcla por 30 segundos en vortex y se adicionaron 20 µL de Proteinasa K y 150 µL de buffer C-L, se mezcló en vortex durante 1 minuto, se incubó a 56°C por 15 minutos y se adicionaron 350 µL de buffer P-D mezclando nuevamente en vortex por 30 segundos. Se centrifugó 10 minutos a 12, 000 x g a temperatura ambiente. Posteriormente, se colocó una columna miniprep en un tubo nuevo de microcentrifuga de 2 ml y se transfirió el sobrenadante obtenido en el paso anterior y se centrifugó un minuto a 12, 000 x g. Se descartó el filtrado del tubo de 2 ml y se regresó la columna miniprep al tubo de 2 ml. Se agregaron 500 µL de buffer W1 a la columna miniprep y se centrifugó 1 minuto a 12, 000 x g. Se descartó el filtrado y se regresó la columna al tubo de 2 ml. Se adicionaron 700 µL de buffer W2 y se centrifugó 1 minuto a 12, 000 x g, se descartó nuevamente el filtrado y se repitió el paso con una segunda alícuota de 700 µL de buffer W2. Se descartó el filtrado y se colocó nuevamente la columna en el tubo de 2 ml. Se centrifugó 1 minuto a 12, 000 x g. Finalmente se transfirió la columna a un tubo nuevo de 1.5 ml para eluir el ADN genómico con 100 µL de eluyente (precalentado a 65°C) sobre la membrana, dejando reposar 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó 1 minuto a 12, 000 x g

4.6.2. Prueba de PCR

Para las reacciones de PCR se utilizaron los ADN's de 4 muestras de micelio aislado a partir de caña de azúcar. La amplificación por PCR fue realizada con oligonucleótidos específicos a *Macrophomina phaseolina*, MpKF1/MpKR1 cuyas secuencias 5'-ccg cca gag gactatcaa ac-3' y 5'-cgt ccgaagcgaggtgta tt-3' respectivamente, amplifican un espaciador intergénico interno (ITS) y producen un producto de talla de 350 pares de bases (pb).

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µL con una mezcla cuyos componentes finales fueron: amortiguador de reacción a una concentración 1X, 2 mM de MgCl₂, 200 µM de cada uno de los cuatro dNTP's, 20 pmoles de cada oligonucleótido, 1 unidad de *Taq* DNA polimerasa (Promega) y una cantidad variable de ADN total entre 30-70 ng. El programa térmico utilizado consistió en una temperatura inicial de 95 °C durante 1 min, seguido de 35 ciclos a 95-56-72 °C durante 30-60-120 seg, y una extensión final de 4 min a 72°C. Se utilizó un termociclador PTC-150 (MJ Research). Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en geles de agarosa a 1.5 %, y las bandas se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta marca UVP y fueron fotografiadas.

4.6.3. Secuenciación

Las 4 muestras amplificadas por PCR fueron secuenciadas directamente en un secuenciador de automatizado ABI con un kit de reacción de terminadores ABI prism y los resultados fueron comparados con las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) del Instituto Nacional de Salud (NIH) de E.E.U.U. (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Las 2 secuencias que se enviaron a GenBank se les asignaron los números KJ577740 y KJ577741 con el que aparecerán en la próxima liberación, donde se confirma que el hongo es *Macrophomina phaseolina*.

4.7. Pruebas de patogenicidad e inoculación en el invernadero

Con el fin de comprobar los postulados de Koch con el hongo aislado y la posibilidad para utilizarlo para valorar el comportamiento de los materiales de caña de azúcar se probaron en canutos de caña, la cual se llevó a cabo en el invernadero del Departamento de Parasitología Agrícola, utilizando 10 variedades : MEX 03-47, SP 80-32, Q 28-2, ITV 92-1424, MEX 03-36, MEX 03-32, B 33-37, CP 2086, LAICA 82-2220 y MEX 03-50

El inóculo utilizado en la prueba de patogenicidad se preparó de la siguiente manera:

La cepa desarrollada en el medio de cultivo PDA se mantuvo bajo condiciones de laboratorio hasta la cobertura completa de la caja Petri. Posteriormente al contenido de 10 cajas se les adicionó agua destilada estéril y fue triturado en la licuadora de uso doméstico, para luego aforar la suspensión a un litro a una concentración de 1×10^6 propagulos por mL. Esta suspensión se coló en un tamiz para eliminar todos los trozos grandes y el resto se pasó a través de una malla triple de manta de cielo. Esta actividad se realizó 10 veces para tener suficiente suspensión del hongo para las 10 variedades a inocular.

Al hongo purificado se le determinó la prueba de patogenicidad de la siguiente forma. Se sembraron en cajas de plástico 7 canutos de caña, los cuales se inocularon con el hongo por 24 horas.

.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El patógeno aislado e identificado en laboratorio concuerdan con los reportados en algunos trabajos realizados en diferentes cultivos por Abawi y Pastor-Corrales (1986) y Dhingra y Sinclair (1978). La especie del fitopatógeno encontrado en el tallo de la caña de azúcar de la variedad MX 69-290 procedente Cosamaloapan, Veracruz fue *Macrophomina phaseolina* con incidencias de 100% bajo condiciones de laboratorio respectivamente, las cuales corresponden con algunas de las mencionadas por Abawi y Corrales (1986) y Dhingra y Sinclair (1978), además de que este hongo que ataca a los cultivos de trigo, sorgo, maíz provocando la pudrición carbonosa en estos cultivos además que pueden transmitirse de un ciclo a otro por los residuos vegetales.

El patógeno que fue aislado en laboratorio concuerda con la morfología descrita por Watanabe (2002) en cuanto a todas las características morfológicas de tamaño de picnidios, conidios, coloración de la cepa en medio de cultivo específico, y tipo de micelio, así como la formación de sus estructuras reproductivas.

Los re-aislamientos resultantes de los postulados de Koch corresponden a las mismas cepas y las mismas especies identificadas morfológicamente que fueron aisladas en el primer postulado (Agrios, 2006), por lo que la pudrición carbonosa y micelio observado en condiciones de invernadero inoculadas en 10 variedades fueron las correspondientes a *Macrophomina phaseolina*.

De las 10 variedades inoculadas las que presentaron un grado de tolerancia más alto son: SP 80-32, Q 28-2, ITV 92-1424, MEX 03-36, MEX 03-32, B 33-37, CP 2086 y MEX 03-50 y las variedades susceptibles son MX 30-47 y LAICA 82-2220.

5.1. Aislamiento del patógeno

El crecimiento micelial se registró a los 8 días posteriores a la siembra en el medio de cultivo de PDA utilizado para el aislamiento del agente causal de la pudrición carbonosa de la caña de azúcar, se observaron colonias de color grisáceo que posteriormente se volvieron negras, con un desarrollo abundante de micelio; lo que coinciden con los resultados reportados por (Watanabe, 2002) para el género *Macrophomina* (Fig. 5).



Fig. 5. Cultivo de PDA con la colonia aislada.

5.2. Postulados de Koch

De las plantas que se inocularon con el hongo para confirmar los postulados de Koch, estas se encontraban en condiciones de 100% de humedad relativa. Los primeros síntomas que se observaron fueron a los 3 meses después de las inoculaciones; las hojas empezaron a secarse por las puntas. A los 5 meses después de la plantación se realizó nuevamente la evaluación de los síntomas en las plantas la planta comenzó a secarse completamente (Fig. 6b y 7b) y al desenterrar los trozos de caña que se sembraron y al partirlos por la mitad se observó presencia de micelio grisáceo (Fig. 6c y 7c), al visualizar al microscopio el micelio se observó una gran cantidad de conidios, como los descritos anteriormente.

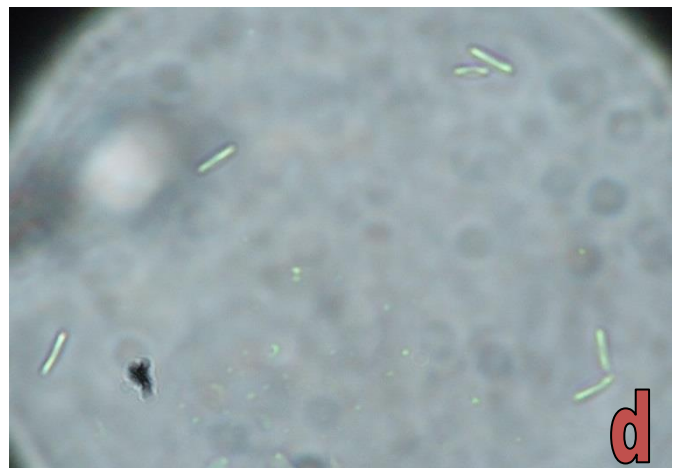


Fig. 6. Variedad LAICA 82-2220; a) Testigo, b) Planta inoculada con el patógeno, c) Tallo de caña con micelio del patógeno y d) Conidios obtenidos de la planta inoculada.



Fig. 7. Variedad Méx 03-47; a) Testigo, b) Planta inoculada con el patógeno, c) Tallo de caña con micelio del patógeno y d) Conidios obtenidos de la planta inoculada.

De las plantas con síntomas más notorios se hizo el re-aislamiento para cumplir con el cuarto postulado de Koch. Se obtuvieron colonias en medio de cultivo PDA similares a las obtenidas de las muestras obtenidas de la región del Papaloapan, Veracruz.

5.3. Identificación del patógeno

5.3.1. Características del hongo

La colonia del hongo en Papa-Dextrosa- Agar eran de color negro y el micelio se mostraba generalmente denso, con aspecto veloso, los conidios (Fig. 6c, 7c y 8c) tuvieron medidas entre $8.22\text{-}13.51\mu\text{m}$ x $2.21\text{-}3.69\mu\text{m}$ (Fig. 9), dispuestos aleatoriamente hialinos, cilíndricos, unicelulares y microesclerocios negros homogéneos en tamaños. Hay ausencia de picnidos (Fig. 8c y 8d) ya que la formación es poco usual en el medio de cultivo. El desarrollo de la colonia fue rápido cubriendo la caja en aproximadamente 5 días a una temperatura de 25°C aunque el desarrollo de los microesclerocios se tardaba aproximadamente 2 semanas.

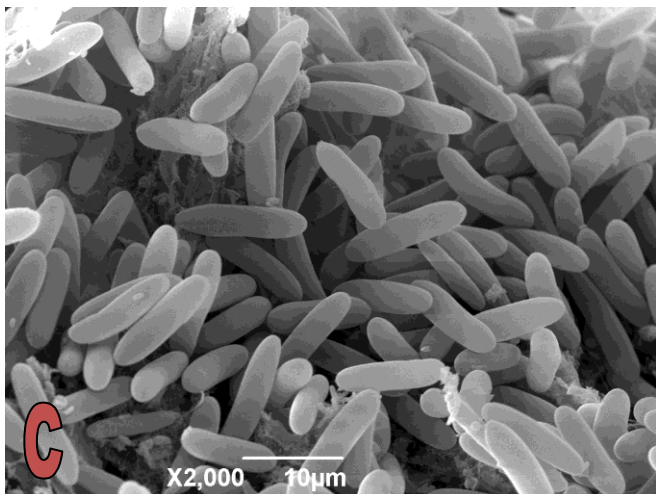
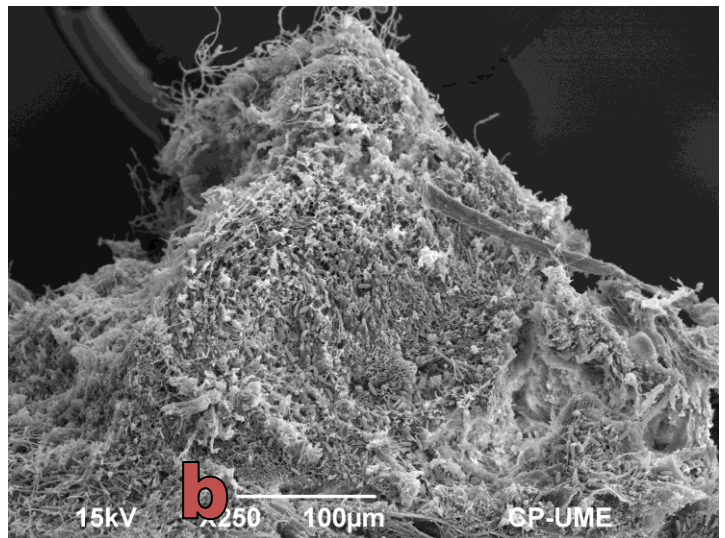


Fig. 8. a) Característica del hongo; a) Picnidio de *M. phaseolina* en microscopio electrónico de barrido, b) Micrografía del picnidio de *M. phaseolina*, c) Micrografía de conidios de *M. phaseolina* y d) Picnidio obtenido del tejido vegetal

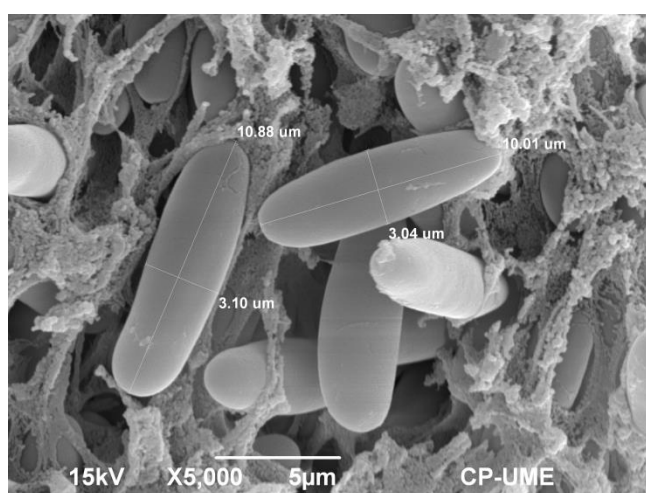
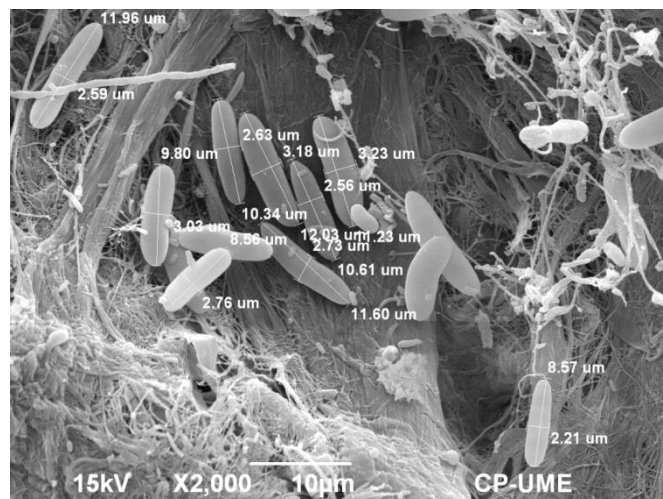
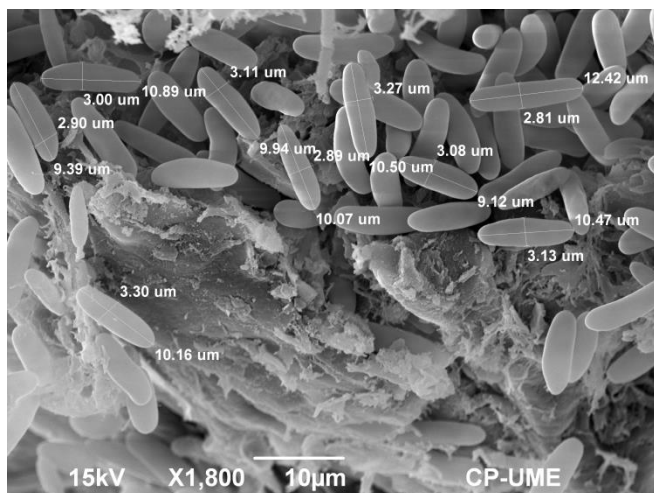


Fig. 9. Medición de conidios

5.3.2. Identificación por PCR

Se logró la amplificación del ADN de la región ITS en las 4 muestras de hongos asiladas a partir de caña de azúcar con lesiones de pudrición carbonosa. Estos primers son específicos a la especie y son utilizados para amplificar la región ITS de *Macrophomina phaseolina* y no se ha encontrado que se unan al menos a 26 microorganismos probados por Kisore-Babu et al. (2007). Se obtuvieron productos de la talla esperada 350 pb (Fig 11).

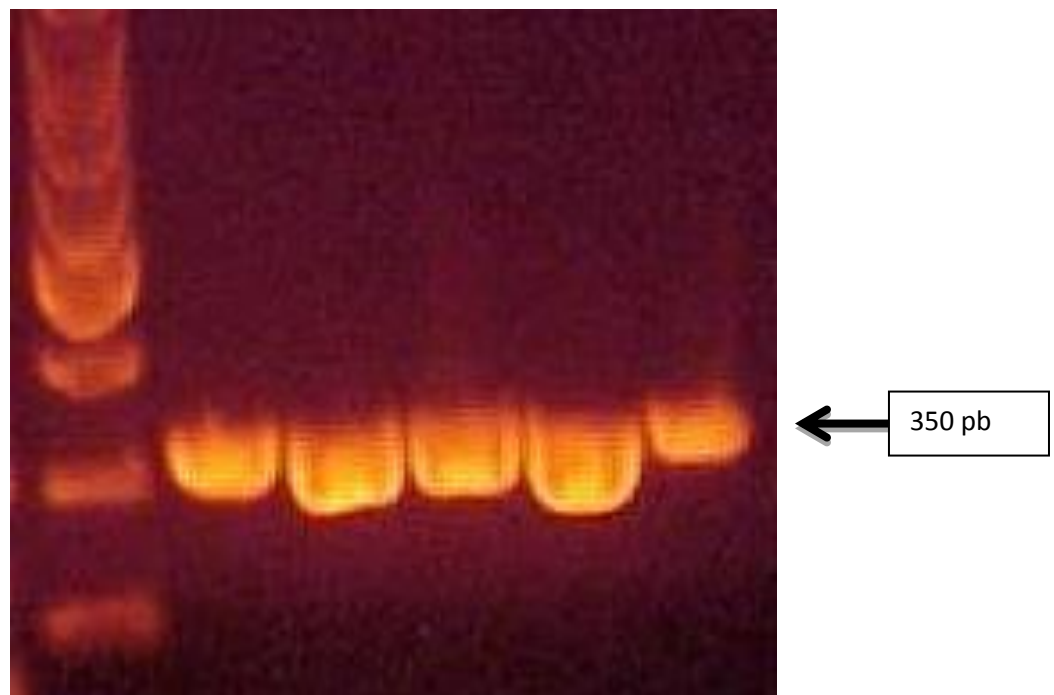


Fig. 10. Amplificación por PCR a partir de ADN's aislados de micelio de hongos de caña de azúcar: Carriles 1 al 4 son productos de 4 aislamientos. Carril 5 control positivo. M es el marcador de peso molecular ladder-100 de AxygenBiosciences.

5.3.3. Secuenciación

Con respecto a la secuenciación de los productos obtenidos, se realizó una comparación de las secuencias obtenidas con las del GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) del Instituto Nacional de Salud (NIH) de U.S.A. encontrándose una similitud de 99% y con secuencias de la especie.

5.3.4. Prueba de patogenicidad

En el **Cuadro 2** se muestran los resultados de la prueba de patogenicidad y las variedades que presentaron los síntomas.

Variedad	Presento síntomas	Imagen del síntoma
MEX 03-50	NO	
LAICA 82-2220	SI	
CP 72-2086	NO	
B 3337	NO	
MEX 03-32	NO	
MEX 03-36	NO	
ITV 92-1424	NO	
Q 28-2	NO	
SP 80-32	NO	
MEX 03-47	SI	

Cuadro 2. Síntomas de prueba de patogenicidad en las variedades de caña de azúcar.

6. CONCLUSIONES

El agente causal de la pudrición carbonosa en caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en México es *Macrophomina phaseolina* y este hongo no se ha reportado en Caña de azúcar en el país.

Las variedades MEX 03-47 y LAICA 32-2220 son las que presentaron mayor incidencia del hongo *Macrophomina phaseolina* en forma de micelio en el interior del tallo de la caña de azúcar.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abawi G.S., Pastor-Corrales M.A. 1986. Screening procedure and virulence of *Macrophomina phaseolina* isolates to beans. *Phytopathology* 76:1064.

Abawi, G.S. and Pastor-Corrales, M.A. 1990. Root Rots of Beans in Latin America and Africa: Diagnosis, Research Methodologies, and Management Strategies. CIAT. Cali, Colombia. 114 p.

Agnihotri, V.P. 1990. Diseases of Sugarcane and Sugarbeet. Revised edition. Oxford & IBH Publishing Co. PVT.Ltd., Nueva Delhi. 483 p.

Agrios G.N. 1986. Fitopatología. Editorial Limusa. México. 447 p.

Barnet L.H. and Hunter B.B. 1972. Illustrated Genera Imperfect Fungi. Third Edition Burgess Publishing Company. Minneapolis, MN, USA. 241 P.

Bressano M.M.; Giachero M.L.; Luna M.C., Ducasse A. D. 2010. An *in vitro* método for examining infection of soybean roots by *Macrophomina phaseolina*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74:201-204.

Daniels J, Roach B.T. 1987. Taxonomy and evolution. In: Heinz DJ (ed) Sugarcane Improvement Through Breeding, vol 11. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp. 7–84.

Dhingra O.D., and Sinclair J.B. 1978. Biology and Pathology of *Macrophomina phaseolina*. Universidad Federal de Vicosa, Vicosa, Brasil. 166p.

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2011. www.fao.org. [Consulta: 15 de Diciembre de 2013].

Flores C.S. 1981. Sugarcane smut in México. *Sugarcane Pathologist Newsletter* 24: 8-10

Flores C.S. 1997. Las enfermedades de la caña de azúcar en México. Pp 143-147.

Ferreira E.A. and Comstock J.C. 1989. Diseases of Sugarcane. Major diseases. C. Ricaud, B.T. Egan, A.G. Gillaspie Jr and Hughes C.G. Eds. Elsevier. Amsterdam Oxford, New York, Tokyo. Pp. 211-225.

Gams, W. 1971. *Cephalosporium-artige Schimmelpilze* (Hyphomycetes). Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.

González, A. y Castañeda, Z. (2008). "Biocombustibles, biotecnología y alimentos Impactos sociales para México", en *Argumentos*. 21(57): 55-83.

Huerta E.R.; Becerra E.N. y Márquez M. 1979. Detección y descripción de la roya (*Puccinia arianthii*) en la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en el estado de Tabasco. Col. Sup. Agric. Trop, Cardenas, Tabasco. 85 P.

INIFAP. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. 2012. Manual de plagas y enfermedades en caña de azúcar para el estado de Morelos. Impresos Lluvia. México PP. 14-19

Juarez L.J. y Valdez B.A. 2000. Resistencia varietal a la enfermedad de la roya de la caña de azúcar (*Puccinia melanocephala*). Programa nacional de variedades del FOCYTCAÑA. P 84

Kisore-Babu, B., A.K. Saxena, A.K. Srivastava, and D.K. Arora. 2007. Identification and detection of *Macrophomina phaseolina* by using species specific oligonucleotide primers and probe. *Mycologia*, 99:797–803.

Malathi, P., R. Viswanathan, P. Padmanaban, D. Mohanraj, and A. Ramesh Sundar. 2002. Compatibility of biocontrol agents with fungicides against red rot disease of sugarcane. *SugaTech* 4(3&4): 131–136.

Martin J.P., Hong H.L. y Wismar C.A. 1961. Boeng Pokkah. Pp 247- 257 In *Sugar- cane diseases of the world*. Vol. 1, Elsevier Publ. Co. New York 592 P.

Mayek-Perez N., Lopez- Castañeda C., Gonzalez- Chavira M., Gaarcia-Espinoza R., Acosta- Gallegos J.A., Martínez de la Vega O., and Simpson J. 2001. Variability of Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* on bases of pathogenesis and AFLP genotype. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59:257-264.

Mihail J.D. and Taylor S.J. 1995. Interpreting variability among isolates of *Macrophomina phaseolina* in pathogenicity, picnidium production, and chlorate utilization. *Canadian Journal of Botany* 73:1596-1603.

Müller, A., Schmidhuber, J., Hoogeveen, J. Y Steduto, P. (2007). "Some insights in the effect of growing bioenergy demand on global food security and natural resources", en Conferencia Internacional Linkages between Energy and Water Management for Agriculture in Developing Countries. Hyderabad, India, 28-31 de enero de 2007.

Ochoa B.F. 1991. La caña de azúcar el dulce que cautivo al mundo. *Revista de SAGARPA*. pp. 3-17

Olaya G., Abawi G.S. 1996 Effect of water potencial on mycelial growth and on production and germination of sclerotia of *Macrophomina phaseolina*. *Plant Dis.* 80:339-339.

Patil, A.S.; Singh, H.; Sharma, S.R.; Rao, G.P. 2007. Morphology and pathogenicity of isolates of *Fusarium moniliforme* causing Pokkahboeng of sugarcane in Maharashtra, Ram RC, Singh A, (eds.). *Microbial Diversity: Modern Trends*, Daya Publishers, New Delhi. pp. 234-263

SAGARPA. 2011. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <http://www.sagarpa.gob.mx/>. [Consulta: 18 de Noviembre de 2013]

Salik N.K. 2007. *Macrophomina phaseolina* as causal agent of charcoal rot of sunflower. *Mycopath* 5(2): 111-118

Sandoval, F.B. 1951. La Industria del Azúcar en Nueva España. Inst. Historia, UNAM. México, 155 p.

Schaad, N.W., Jones, J.B., and Chun, W. 2002. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. American Phytopathological Society. Third Edition. APS Press. 373 p.

Sheldon J.L. 1904. A corn mold (*Fusarium moniliforme* sp.) New Agri. Exp. Sta. Ann Report 17: 23-32

SIAP. 2011. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera , SIACON. Consulta de bases de indicadores de Producción Nacional y Estatal. www.siap.sagarpa.gob.mx [Consulta: 10 de Diciembre de 2013].

Singh, R.P., and S. Lal. 1996. Air borne propagules of *Colletotrichum falcatum* and their role in the epidemiology of sugarcane red rot. Indian Phytopathology 49: 89–91.

Subirós, R.F. 1995 El cultivo de la Caña de azúcar. Editorial asoingraf. Costa Rica. Pp. 3-12

Valdez B.A.; Ortiz G.C.; y Flores C.S. 2000. Resistencia genética a la roya (*Puccinia melanocephala* Sid) de 38 clones de caña de azúcar. Memoria IX día del cañero. Resultados de investigación en el cultivo de caña de azúcar. Colegio de Postgraduados Campus Tabasco. Pp 59-66

Victoria J.L., Guzmán M.L. y Ángel J.C. 2007. Enfermedades de la caña de azúcar en Colombia. CENICAÑA; 29(1): 265-269.

Viswanathan, R., C. Chinnaraja, R. Karuppaiah, V. Ganesh Kumar, J. Jenshi Rooba, and P. Malathi. 2011a. Genetic diversity of sugarcane grassy shoot (SCGS)-phytoplasmas causing grassy shoot disease in India. Sugar Tech 13: 220–228.

Watanabe T.2002. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultural Fungi and Key to Species.CRC PRESS. 2da edición. USA. Pp. 203-209.

Wheeler H. 1975. Plant pathogenesis. Academic, Press. New York and London. pp. 2-3.

Wrather, J. A., Kendig, S. R. and Tyler, D. D. 1998. Tillage effects on *Macrophomina phaseolina* population density and soybean yield. Plant Dis. 82:247-250