

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN CAÑA DE AZÚCAR.

Jairo Cristóbal- Alejo¹, Juan Candelero –De la Cruz¹, Felicia Amalia Moo- Koh¹,
C. Aarón Rangel-Ortega¹ y Calos Flores-Revilla¹.

¹Estación Nacional Cuarentenaria de la Caña de Azúcar, Yucatán.
jairoca54@hotmail.com.

RESUMEN

En México se cultivan al menos 107 variedades mexicanas y 47 variedades extranjeras de caña de azúcar, las más cultivadas son la MEX 69-290 y la CP 72-2086 las cuales representan el 24.61 % y el 37.89%, respectivamente de la superficie nacional; algunas variedades poseen alta susceptibilidad a la virulencia de hongos fitopatógenos, lo que causa pérdidas de producción. La identificación específica de estos hongos es importante para establecer estrategias preventivas y correctivas. El presente estudio tuvo como objetivo, identificar a las especies de hongos fitopatógenos locales, aislados en distintas variedades de caña de azúcar. El estudio se hizo en la Estación Nacional Cuarentenaria de la Caña de Azúcar ubicado en Tizimín, Yucatán; la cual cuenta con 125 variedades en cuarentena abierta, procedentes de Guatemala, Colombia, Venezuela, Francia y EE.UU. Se hicieron muestreos periódicos en las variedades con síntomas inducidos por hongos. Las muestras se desinfectaron con NaClO al 2% y un doble lavado con agua destilada estéril. Se utilizó medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA) para el aislamiento de hongos. La identificación preliminar se realizó con claves morfotaxonómicas y su confirmación mediante amplificación de la región ITS1-5.8s-ITS2 del rDNA, utilizando iniciadores ITS1 e ITS4. Se encontró la presencia de los hongos: *Curvularia lunata*, *Exserohilum rostratum*, *Nigrospora oryzae*, induciendo manchas foliares y *Fusarium oxysporum* y *Fusarium moniliforme* presentes en las variedades en campo y semillero, causando muerte descendente de la planta y pokkah boeng. La comparación de las secuencias con el Banco de Genes del Nacional Center For Biotechnology Information, mostró un rango de identidad del 99- 100%.

Palabras clave: taxonomía, anamorfo, fungi, *Saccharum officinarum*.

ABSTRACT

In Mexico at least 107 Mexican varieties and 47 foreign varieties of sugarcane are grown, the most cultivated are the MEX 69-290 and CP 72-2086 which represent 24.61% and 37.89%, respectively of the national area; some varieties have high susceptibility to virulence of pathogenic fungi, causing production losses. Specific identification of these fungus is important to establish preventive and corrective strategies. This study aimed to identify local species of plant pathogenics fungus, isolated on different varieties of sugarcane. The study was done in the National Quarantine Station for Sugarcane located in Tizimin, Yucatan; which has 125 varieties in open quarantine, from Guatemala, Colombia, Venezuela, France and the USA periodic samplings were made in varieties with symptoms induced by fungi. The samples were disinfected with NaClO al 2% and double wash with sterile distilled water. Culture medium was used Potato-Dextrose-Agar (PDA) for isolation of fungus. The preliminary identification was performed with morfotaxonomics keys and confirmation by amplification of the ITS1-

5.8S-ITS2 region of rDNA, using primers ITS1 and ITS4. It was found to: *Curvularia lunata*, *Exserohilum rostratum*, *Nigrospora oryzae*, inducing leaf spot and *Fusarium oxysporum* and *Fusarium moniliforme* present in the field and seed varieties, causing dieback of the plant and pokkah boeng. The comparing the sequences with the GenBank National Center for Biotechnology Information, this showed a range of 99- 100% identity.

Keywords: Taxonomy, anamorph, fungus, *Saccharum officinarum*.

INTRODUCCIÓN

En México existen diferentes zonas productoras de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), este cultivo es afectado por enfermedades de etiología fungosa como la roya café (*Puccinia melanocephala*) y en menor grado por la roya naranja (*Puccinia kuehnii*). Éstas ocasionan pérdidas de producción considerables en variedades susceptibles. Sin embargo, la presencia de patógenos virulentos induce la vulnerabilidad de las variedades al ataque de otros hongos fitopatógenos a los cuales no se le debe restar importancia (Bermúdez *et al.*, 2015). Para que una enfermedad se desarrolle se necesita de condiciones ambientales favorables, un hospedante susceptible y un patógeno virulento, y al menos el 60 % de las enfermedades son causadas por hongos, debido a su diversa distribución a nivel mundial y principalmente en el trópico, junto con el cambio climático, los hongos oportunista o secundarios, se han convertido en patógenos de gran importancia agrícola, lo que implica una disminución en la calidad y el rendimiento del cultivo; la presencia de diversos hongos fitopatógenos en el cultivo de caña, demanda investigación enfocada a la identificación precisa para implementar con éxito un esquema de control y manejo durante el ciclo del cultivo (Agrios, 1999; Srivastava, 2016). Por lo tanto, no es posible generalizar sobre la incidencia de las enfermedades ni sobre su control o tratamiento, sin realizar una identificación y caracterizar cada caso. La identificación precisa de los hongos fitopatógenos que se presentan en campo posibilita, tanto la generación de información del rol ecológico de una especie así como las posibles consecuencias que potencialmente se pueden presentar y la manera de controlarlos (Ochoa *et al.*, 2007). La identificación a nivel especie de hongos fitopatógenos, en forma rápida y eficaz es mediante el análisis la secuencia de regiones del DNA (Aguín *et al.*, 2001; Seifert *et al.*, 2007). El presente estudio tuvo como objetivo, aislar e identificar especies de hongos fitopatógenos locales, presentes en variedades de caña de azúcar.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en la Estación Nacional Cuarentenaria de la Caña de Azúcar (ENCCA), ubicado en Tizimín, Yucatán. Cuyo clima predominante es cálido subhúmedo con lluvias en verano, con temperatura media anual de 25.3 °C, con máximas en el mes de mayo de hasta 42°C y mínimas en enero de hasta 15 °C, y lluvias en los meses de junio a octubre de hasta 650 mm.

La Estación Cuarentenaria Nacional de Cuarentena de la Caña de Azúcar (ENCCA) cuenta con al menos 100 variedades, cuyos orígenes son: Guatemala, Colombia, Venezuela, Francia y EE.UU, de las cuales se realizaron muestreos periódicos entre los meses de julio a diciembre, en campo. Las muestras presentaron síntomas inducidos aparentemente por hongos.

Aislamiento e identificación fúngica

En el laboratorio de la ENCCA, de tejidos con síntomas se examinaron bajo el microscopio estereoscópico con la finalidad de observar estructuras fúngicas (micelio, cuerpos fructíferos y esporas). Las muestras fueron desinfectadas con NaClO al 2% para eliminar organismos saprofitos contaminantes y aislar los patógenos causales de los síntomas. Posteriormente, cada muestra se depositó en medio de cultivo Papa

Dextrosa Agar (PDA) y se hicieron cámaras húmedas; después de su crecimiento micelial en PDA o en las cámaras húmedas se procedió a la identificación genérica, mediante las características y criterios tradicionales: desarrollo y coloración de micelio, forma y tamaño de esporas (Barnett y Hunter, 2006).

Caracterización molecular

La identificación molecular a nivel especie, fue con la obtención del DNA, de acuerdo a la metodología de Liu *et al.* (2002) con modificación por Moo *et al.* (2014). Se utilizó el Kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep TM. Con el DNA extraído, se realizó la amplificación de la region interna ITS1 e ITS2 entre los genes ribosomales (rADN) 18S, 5.8S y 28S de cada aislado fúngico. La mezcla de reacción consistió en: iniciadores ITS1 e ITS4 (1 mM), MgCl₂ (3 mM), dNTP (0.2 mM), Taq DNA polimerasa (2.5 unidades), y ADN (100 ng) para un volumen final de 50 µL, bajo las siguientes condiciones de reacción: desnaturalización inicial de 2 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos (desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineación a 54 °C por 30 s y una extensión de 1 min a 72 °C) con una extensión final de 5 min a 72 °C (White *et al.*, 1990). Para la secuenciación, los productos de DNA amplificados se enviaron a la empresa MacrogenUSA. El análisis de las secuencias se, analizaron y compararon con el banco de genes de NCBI (National Center for Biotechnology Information) con ayuda del programa Blast.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Caracterización de aislados fúngicos

La identificación genérica de los aislados fue posible después de 72 horas de incubación. Al inicio se observó crecimiento micelial en cajas con medio de cultivo PDA, el cual culminó ocho días después de su purificación. Se obtuvieron cinco aislamientos de diferentes variedades y orígenes pertenecientes a cuatro géneros fúngicos (Cuadro I).

Cuadro 1: Identificación genérica de aislados fúngicos en variedades de caña de azúcar

Clave	Género del aislado	Órgano	Origen de la Variedad
FSOT	<i>Fusarium</i> sp.	Tallo	Guatemala
ITC15	<i>Nigrospora</i> sp.	Hoja	Colombia
ITC16	<i>Helminthosporium</i> sp.	Hoja	Venezuela y EE. UU
ITC19	<i>Curvularia</i> sp.	Hoja	Cuba
ITC21	<i>Fusarium</i> sp.	Tallo	Colombia

El crecimiento de los aislados fue rápido lo que permitió la identificación molecular con la utilización de las metodologías utilizadas. Los productos de DNA fueron de aproximadamente 600 pb los cuales con la secuenciación y comparación con el bando de genes del NCBI se logró la identificación correcta con un rango de porcentaje de identidad del 99 a 100% (Cuadro II) a continuación se describe las especies fitopatógenas identificadas.

Cuadro 2. Identificación específica de hongos aislados

Clave	Identificación morfológica	Identificación molecular			Teleomorfo
		Homología	I (%)	NA	
FSOT	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	JN400714	<i>Giberella</i> sp.
ITC15	<i>Nigrospora</i> sp.	<i>Nigrospora oryzae</i>	99	EU272488	<i>Khuskia oryzae</i>
ITC16	<i>Helminthosporium</i> sp.	<i>Exserohilum rostratum</i>	99	KC150019	<i>Setosphaeria rostrata</i>
ITC19	<i>Curvularia</i> sp.	<i>Curvularia lunata</i>	100	KJ767095	<i>Cochliobolus lunatus</i>
ITC21	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium moniliforme</i>	99	JF499676	<i>Gibberella moniliformis</i>

I(%): Porcentaje de identidad

NA: Número de acceso de la secuencias con la que se obtuvo el porcentaje de identidad

Fusarium sp. (FSOT) y *Fusarium* sp. (ITC21). Los resultados obtenidos de la comparación de secuencias de la región ITS con la base de datos del NCBI, muestra un 99% de identidad del *Fusarium* sp. (FSOT) con *Fusarium oxysporum* este organismos es agente causal de la fusariosis o marchitez vascular, el género *Fusarium* es considerado cosmopolita y algunas especies son patógenas de tallos y raíces. En los cultivos de caña pueden sobrevivir en el suelo hasta por tres años, así como un año en el material de desecho de la cosecha. En los muestreos realizados se encontró en el tallo de las variedades de caña en desarrollo (Figura a1-a3). El aislado de *F. oxysporum* se observó en medio de cultivo PDA de color beige esponjoso con presencia de microconidios, ovals y cilíndricos, con uno a dos células, también macroconidios alargados, septados en forma acanalada. Este hongo ha sido reportado en leguminosas como el garbanzo y gramíneas en caso de arroz, induciendo síntomas de amarillamiento vascular y marchitez vascular, el primero se caracteriza por el desarrollo de clorosis, amarillamiento y necrosis de los folíolos de las hojas inferiores, que dan lugar a la defoliación prematura de éstas (Bermúdez *et al.*, 2015).

Para *Fusarium* sp. (ITC21) aislado de variedades provenientes de Colombia, se obtuvo un 99% de identidad con la especie de *Gibberella moniliformis* la cual es nombrada así en la fase sexual, sin embargo, este organismo fue aislado en su fase asexual cuya especie es *Fusarium moniliforme*, esta especie es considerada uno de los agentes causales de la enfermedad de Pokkah boeng término Javanes que significa malformación, punta retorcida o cogollo retorcido, en medio de cultivo se observó el micelio de varios colores, desde blanco pálido pasando por rosado y llegando a púrpura, denso con apariencia afelpada y polvoriento debido a la formación de macroconidios. Los síntomas de este patógeno fueron, manchas cloróticas hacia la base de las hojas jóvenes, la base de las hojas afectadas a menudo es más estrecha en comparación con las hojas normales, una pigmentación rosada anaranjada que cruzaba los entrenudos (Figura e1- e3). Esta especie ha sido reportada como patógena de caña de caña de azúcar. El patógeno se disemina través del aire, las esporas se mueven de un lugar a otro, pudiendo colonizando hojas, flores y tallos, la dispersión de esporas depende de las condiciones climáticas (Mohammadi *et al.*, 2012). La presencia y dispersión de la enfermedad de forma secundaria es por esquejes infectados, agua de riego, salpicaduras de agua de lluvia y suelo, también se puede dispersar por medio de la semilla contaminada (Vishwakarma *et al.*, 2013). También, el patógeno puede sobrevivir hasta por un año en restos vegetales y en condiciones naturales, el clima frío y seco favorece la supervivencia del hongo.

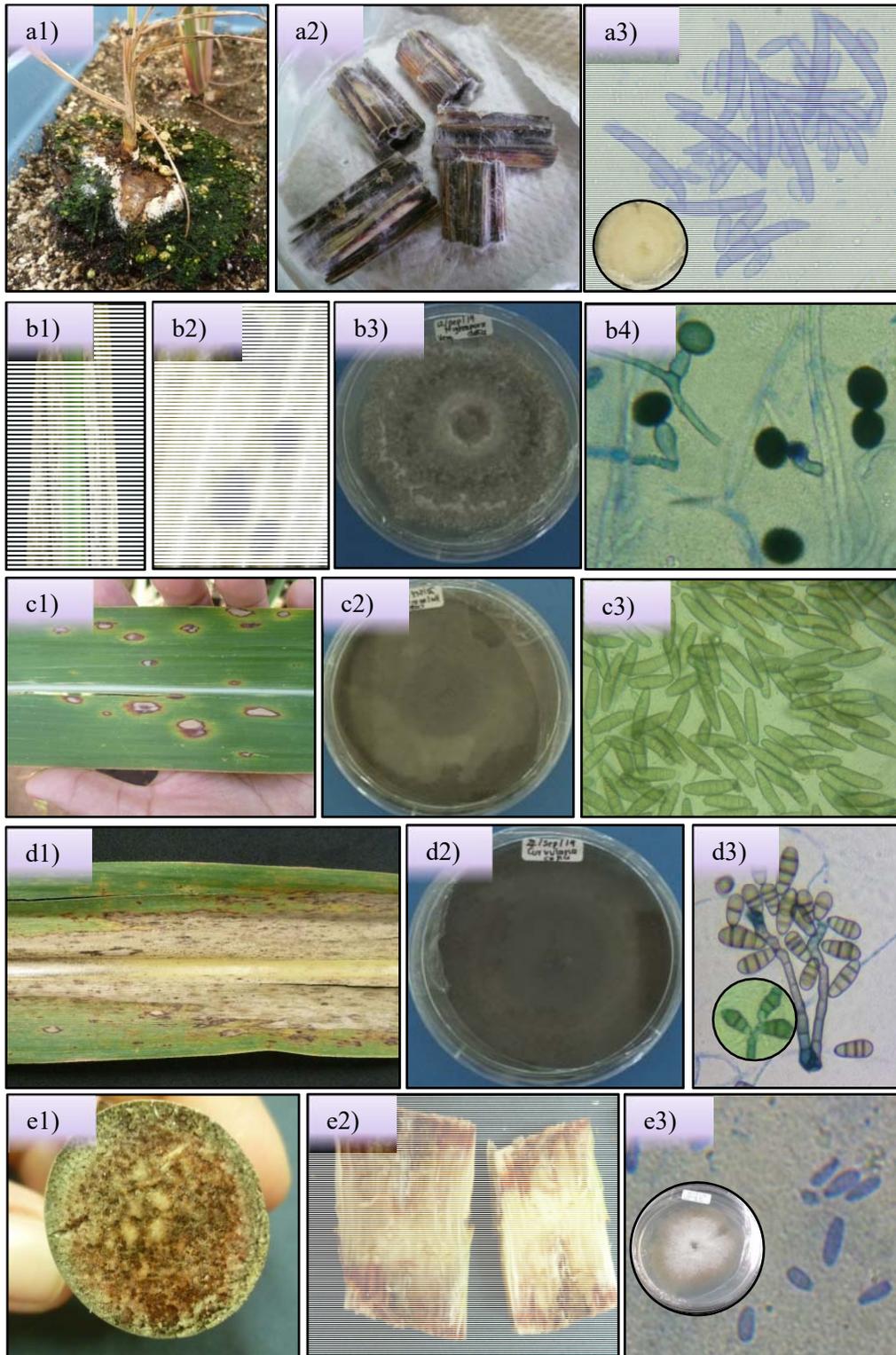


Figura 1: Hongos Fitopatógenos presentes en caña de azúcar, a1)- a3) *Fusarium oxysporum* (FSOT) , b1)- b4) *Nigrospora oryzae* (ITC15), c1)- c3) *Exserohilum rostratum* (ITC16), d1)- d3) *Curvularia lunata* (ITC19), y e1)- e3) *Fusarium moniliforme* (ITC21).

Nigrospora sp. (ITC15) fue identificado con un 99% de identidad con *Nigrospora oryzae* en su reproducción asexual y se aisló de variedades de Colombia, es un hongo patógeno en plantaciones de arroz y maíz, especies de la misma familia de la caña de azúcar, al principio, este organismo se desarrollo en medio de cultivo con micelio de color blanco, y conforme se llenaba la caja de Petri, el micelio se tornó color gris, con aglomeraciones conidiales; en el tejido foliar se observaron manchas irregulares secas y con presencia de conidios (Figura b1- b4). Este fitopatógeno es un agente causal de la fumagina en caña de azúcar, ya que establecen una relación a partir de los excrementos azucarados que desechan los insectos chupadores. En algunos cultivos como el arroz, *N. oryzae* se encuentra en semillas en donde se observa una coloración gris ceniza con puntos negros, con afectaciones del 6 al 24 % (Pineda *et al.*, (2007)

Helminthosporium sp. (ITC16) fue identificado como *Exserohilum rostratum* con un 99% de identidad, otros sinónimos del género son nombrados como *Drechslera*, *Bipolaris* y *Exserohilum* cuando su reproducción es de forma asexual, en forma sexual se nombra como *Setosphaeria rostrata*. Los síntomas que presentaron las variedades de Venezuela y EE. UU, fueron manchas foliares ovales, con halos de color rojizo, con el centro seco y abundante en hojas adultas en variedades de ambos orígenes. Conidios ligeramente curvos, obclavados, no rostrados, castaños, de 8-10 pseudoseptos; las células conidiales con extremos claros, separado por septos más oscuros y anchos que los otros pseudoseptos (Figura 1, c1- c3). *E. rostratum* causa síntomas similares en *Caryota mitis* y *Veitchia merrilli* especies diferentes a *S. officinarum* considerándose como un hongo cosmopolita (Moo *et al.*, 2014)

Curvularia sp. (ITC19). Con un porcentaje de identidad del 100% se identificó como *Curvularia lunata* la cual en su estado teleomorfo es *Cochliobolus lunatus*. El hongo *C. lunata* se encontró en hojas adultas en variedades de Cuba; induciendo manchas cloróticas secas, circulares a ovales, tornándose pardas con el borde marrón rojizo. En un estudio con *C. lunata* en *Thrinax radiata* se reportaron (Moo *et al.*, 2014) características similares a las del presente estudio como el color micelial en medio de cultivo PDA, al inicio fue de marrón oscuro a negro, conidios en forma de curva, las puntas ovaladas con cuatro células y cada conidio con una célula más grande y curva, los conidios y conidióforos de forma libre (Figura d1-d3), es un miembro de la familia Dematiaceae cuyas características son hongos de color oscuro, se denomina como un hongo causantes de manchas foliares (Manamgoda *et al.*, 2012).

CONCLUSIONES

Las especies *Fusarium oxysporum* (FSOT) y *Fusarium moniliforme* (ITC21) son hongos fitopatógenos que afectan los tallos de caña de azúcar, *Nigrospora oryzae* (ITC15), *Exserohilum rostratum* (ITC16) y *Curvularia lunata* (ITC19), son especies causantes de manchas foliares y presentes en las variedades del cultivo.

REFERENCIAS

Agrios G., N. (1999). Fitopatología. Ed. Limusa. Noriega. 838 p.

Barnett, H. y B. Hunter. (1999). Illustrated Genera of Imperfect Fungi. APS Press. Fourth edition. St. Paul. Minnesota. USA. 218 p.

Bermúdez, G. M. de J., Cárcamo R. A., Silva R. H. V., Velázquez M. J. J., Orozco S. M., y Álvarez C. M. (2015). Identificación de los agentes causales de la roya café (*Puccinia melanocephala*) y la roya naranja (*P. kuehni*) en caña de azúcar. Revista Mexicana de Fitopatología. 33 Suplemento: 60-61.

Liu, L., Pearce G., Lilley G., Coloe S., Baird R., and Pedersen, J. (2002). PCR identification of dermatophyte fungus *Trichophyton rubrum*, *T. soudanense* and *T. gourvilii*. Mycology 51: 117-122.

Manamgoda, D. S., Cai L., McKenzie E. H. C., Crous P. W., Madrid H., Chukeatirote E., Shivas R. G., Tan Y. P., and Hyde K. D. (2012). A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris* - *Cochliobolus* - *Curvularia* Complex. Fungal Diversity 56:131-144.

Mohammadi, A., Nejad R.F., Mofrad N. N. (2012). *Fusarium verticillioides* from sugarcane, vegetative compatibility groups and pathogenicity. Plant Protect. Sci. 48 (2): 80-84.

Moo K., F. A., Cristóbal A. J., Reyes R. A., Tun S. J. M., Sandoval L. R., Ramírez P. J. A. (2014). Actividad *in vitro* del extracto acuoso de *Bonellia flammea* contra hongos fitopatógenos. Agrobiencia 48: 833- 845,.

Ochoa, J. L., Hernández M. G., Lastiesnere B. H., León de la Luz J. L., y Larralde C. P. (2007). Aislamiento e identificación de hongos patógenos de naranja *Citrus sinensis* L. Osbeck cultivado en Baja California Sur, México. Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de alimentos Reynosa, México 5 (5): 352-359.

Pineda, J. B., Colmenárez O., Mendez N., y Gutiérrez L. 2007. Niveles de inóculo de hongos fitopatógenos asociados a la semilla de arroz (*Oryza sativa*). Rev. Fac. Agron. (LUZ). 24: 481-500.

Seifert, K. A., Samson R. A., DeWaard J. R., Houbraken J., Levesque C. A., Moncalvo J. M., Seize G. J. and Hebert P. D. N. (2007). Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. PNAS, The National Academy of Sciences of the USA 104 (10): 3901-3906.

Srivastav, S. 2016. Molecular Diagnostics for Major Diseases of Sugarcane. In: P. Kumar *et al.* (eds.), Current Trends in Plant Disease Diagnostics and Management Practices, Fungal Biology. Division of Crop Improvement, ICAR-Indian Institute of Sugarcane Research. © Springer International Publishing Switzerland, India.

Vishwakarma S.K., Kumar P., Nigam A., Singh A., Kumar A., (2013). Pokkah Boeng: an emerging disease of sugarcane. J Plant Pathol Microb 4: 170.

White, T. J., Bruns T., Lee S., and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Innis, M. A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J. J., White, T. J. (eds). Academic Press, San Diego, CA. pp. 315-321.