

**Aislamiento e identificación de la microbiota patógena presente en hojas y tallos de *Saccharum officinarum* procedentes de cultivos del Estado de Veracruz.**

Isaac Juan Luna Romero<sup>1</sup>, Javier Melchor Orozco<sup>1</sup>, Ramón Cruz Camarillo<sup>1</sup>, Luz Irene Rojas Avelizapa<sup>1</sup>, Katia Angélica Figueroa Rodríguez<sup>2</sup>, Francisco Hernández Rosas<sup>2</sup>.

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN. México, D.F. 2. Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba, Km 348 carretera Federal Córdoba – Veracruz, Amatlán de los Reyes, Ver. CP 94946. ([fhrosas@colpos.mx](mailto:fhrosas@colpos.mx)).

El cultivo de la caña de azúcar es afectado por condiciones ambientales como clima, suelos, también por los diversos factores biológicos. Entre estos últimos se encuentran diversas patologías que en algunos casos limitan el desarrollo del cultivo, ocasionando fuertes pérdidas económicas. En algunos lugares del Estado de Veracruz, la caña de azúcar todavía se propaga mediante plantación de esquejes o trozos de caña, de cada nudo sale una planta nueva idéntica a la progenitora. Al crecer la planta acumula azúcar en su tallo, que luego es cortado cuando está maduro. La planta retoña varias veces y puede seguir siendo cosechada; sin embargo la planta se deteriora con el tiempo y por el uso de maquinaria que daña sus raíces, de modo que deben replantarse cada siete a diez años, aunque existen cañaverales con 25 o más años de edad. En este tipo de cultivos es mucho más frecuente la transmisión de diversas enfermedades, pues las nuevas plantas proceden de la misma fuente. Esto no sucede cuando las nuevas plantas son obtenidas de cultivo de tejidos, donde puede controlarse su sanidad.

**Objetivo**

El objetivo fue demostrar la presencia de patógenos en plantas de caña obtenidas a partir de esquejes procedentes del Ingenio San Miguelito, ubicado en Córdoba, Ver., del Ingenio Central Progreso de Paso del Macho, Ver. y del Ingenio Compañía Industrial Azucarera SA de CV (CIASA), en Hueyapan de Ocampo, Ver.

## **Metodología**

### *Obtención de las muestras*

Se colectaron 80 muestras de hojas, tallos y raíces de cultivos de caña de azúcar procedentes del Estado de Veracruz, las cuales fueron seleccionadas por la presencia de síntomas visuales de enfermedades, como manchas de color rojizo pálido, intercaladas con manchas blancas horizontales en el tejido interno; también manchas de color rojo a lo largo de la nervadura central, además de lesiones oscuras.

### *Procesamiento de las muestras*

Todas las muestras fueron desinfectadas superficialmente con una solución acuosa de hipoclorito de sodio al 3 % v/v, luego fueron retenidas por 1 min aproximadamente en etanol al 70% v/v, para luego enjuagarlas en agua destilada durante el tiempo necesario para eliminar las soluciones anteriores (3-5 min cada uno). Posteriormente, se escogieron muestras de 3 a 5 mm, de las zonas afectadas que fueron sembradas en el medio papa dextrosa agar (PDA). Otras muestras fueron maceradas en mortero estéril y sembradas por estría cruzada en las mismas placas de PDA a 28°C.

### *Purificación y conservación de los aislados*

Después de lograr el crecimiento de colonias, se comprobó que éstas tuvieran una morfología fúngica homogénea, sin la presencia de bacterias contaminantes. Una vez confirmada su pureza, se hicieron siembras por triplicado en placas con PDA, para observar la mayor cantidad posible de caracteres morfológicos, como color y forma de la colonia, tipo de crecimiento, y presencia de estructuras microscópicas, entre otras características, para así realizar la identificación morfológica macro y microscópica.

#### *Determinación del perfil exoenzimático*

Los ensayos se realizaron en cajas de Petri conteniendo un medio de cultivo sólido, formulado con un medio sintético basal compuesto (en g/l de agua destilada) por los siguientes ingredientes Citrato diamónico, 0.625; NaCl, 0.250; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.375; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.375; MgSO<sub>4</sub>, 0.275. Para producir y evaluar cada enzima se añadió un inductor particular. Para el caso de proteasas se usaron caseína y elastina al 1%, para quitinasas se agregó quitina coloidal al 12% peso húmedo; para quitosanasas se añadió quitosana coloidal al 3%; la celulasa se indujo con carboximetilcelulosa al 1%; las fosfolipasas con yema de huevo al 3%, las lipasas con mantequilla fundida al 5% más el colorante rezasurina al 0.01% como indicador de pH, y las esterases con tween 80 al 4%; las amilasas con almidón al 1% y las DNasas con DNA de esperma de salmón al 0.03% más el colorante azul de ortotoloudina al 0.0025%.

Los ensayos se realizaron inoculando una fracción obtenida con un sacabocados estéril a partir de una colonia típica de cada hongo ensayado, incluyendo un testigo positivo o negativo, dependiendo de la enzima en estudio. Después se incubaron a 28°C durante el tiempo requerido para observar los halos de hidrólisis resultantes de la actividad enzimática evaluada.

#### *Técnicas de conservación de los hongos*

Se mantuvieron en tubos de ensayo de 10 ml con 3 ml de PDA inclinado.

### **Resultados**

A partir de las manchas rojizas de hojas y tallos se aisló a *Colletotrichum falcatum* y *Colletotrichum gloesporoides*, hongos responsables de la podredumbre roja de la caña (Figura 1 y 2).

XXXIV Convención ATAM  
"Sergio Villa Godoy"  
31 de julio, 1, 2 y 3 de agosto del 2012, WTC Veracruz, Boca del Río, Ver.



**Figura 1. Muestras Biológicas de partes enfermas de plantas de caña.**



*Colletotrichum falcatum*



Acérvulos y conidios de *C. falcatum*



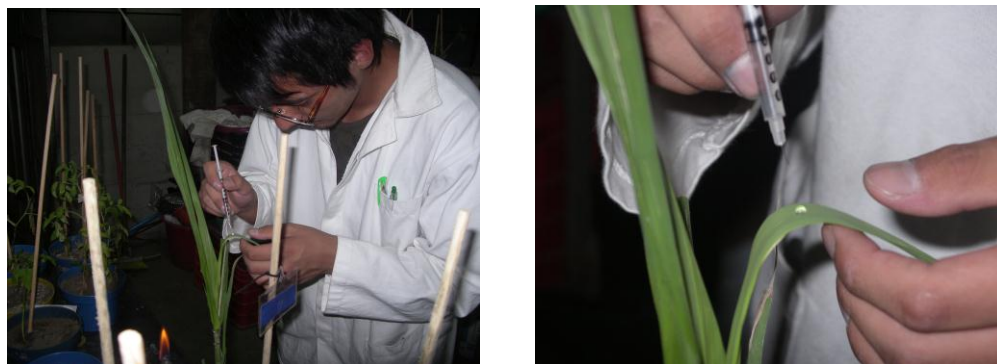
*Colletotrichum gloesporoides*



conidios de *C. gloesporoides*

**Figura 2. Morfología colonial y microscópica de *C. falcatum* y *C. gloesporoides***

Posteriormente se realizaron pruebas de patogenicidad inoculando conidios de *C. falcatum* y *C. gloesporoides* en plantas sanas de caña a través de heridas provocadas, y también mediante aspersión, manteniendo siempre un testigo sin inocular (Figura 3). Al cabo de 30 días se observaron los primeros síntomas de la enfermedad, tanto en la planta con heridas como en la inoculada mediante aspersión (Figura 3).



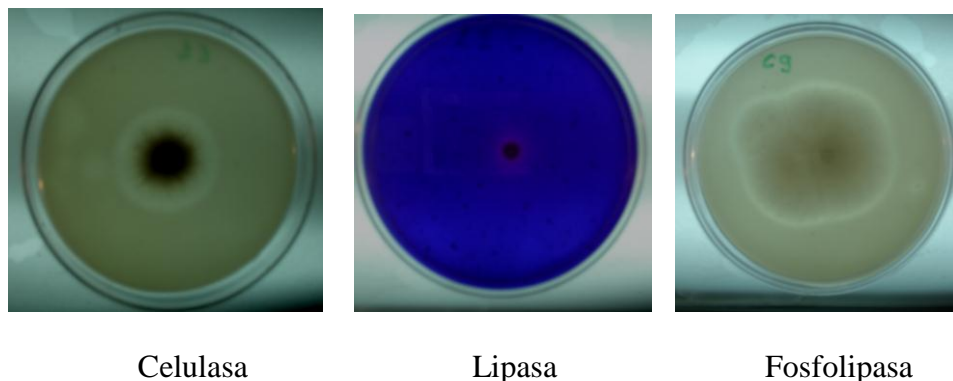
Inoculación de Plantas sanas



**Figura 3. Pruebas de patogenicidad, inoculando los conidios de *C. falcatum* y *C. gloesporoides* en plantas de caña sanas para reproducir la enfermedad.**

Para poder explorar el posible mecanismo mediante el cual se introduce el hongo en la planta, se determinaron las actividades de proteasa, quitinasa, quitosanasa, celulasa, lipasa, fosfolipasa, xilanasa y esterasa, encontrando que presenta una alta actividad de celulasas,

fosfolipasas y lipasas (Figura 4), lo cual hace suponer que estas enzimas son un factor importante en la penetración e infección de la planta por el hongo. Cabe destacar también que en estos hongos fitopatógenos, la producción de las enzimas referidas se da desde las 36 h de crecimiento del hongo. Además a diferencia de lo encontrado en los hongos endófitos donde muchas de sus enzimas se secretan pero permanecen pegadas a las células, en el presente caso las enzimas sí son liberadas del todo al medio.



**Figura 4. Halos de hidrólisis que demuestran la actividad de celulasa, lipasa y fosfolipasa expresada por *C. falcatum* a las 48 h de incubación.**

Es posible por lo tanto que el estudio de las enzimas mencionadas, pueda aportar nuevos datos que contribuyan a esclarecer el mecanismo de infección. De estar involucradas, la inhibición de la síntesis de tales enzimas podría controlar el efecto patogénico de los hongos estudiados. Esto sin embargo puede considerarse aún una investigación en fase preliminar.

#### **Agradecimientos**

Al Proyecto Nacional SNITT – COFUPRO – FPV “DISEÑO DE UN PROGRAMA COMTEMPORÁNEO DE MANEJO INTEGRADO DE MOSCA PINTA EN CAÑA DE AZÚCAR”. Al Colegio de Postgraduados mediante la LPI 13: Comunidades Rurales Agrarias, Ejidos y Conocimiento Local. A los Proyectos SIP-IPN 20121524 y 20121549.