

Primer reporte de pokkah boeng en caña de azúcar de la Huasteca Potosina

Fabiola Medina-Osti¹
Adriana Gutiérrez-Díez^{1§}
Salvador Ochoa-Ascencio²
Enrique Ignacio Sánchez-González³

¹Facultad de Agronomía-Universidad Autónoma de Nuevo León. Francisco Villa s/n, Colonia Exhacienda El Canadá, General Escobedo, Nuevo León. CP. 66054. Tel. 8113404399, ext. 3517. (fameos9@gmail.com). ²Facultad de Agrobiología 'Presidente Juárez'-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Paseo General Lázaro Cárdenas y Berlín s/n, colonia Viveros, Uruapan, Michoacán. CP. 60170. Tel. 452 5236474. (salvador.ochoa@umich.mx). ³Universidad Federal de Lavras-Departamento de Fitopatología. Lavras, MG, Brasil. CP. 37200-900. Tel. 55 353829 1122. (ei.sanchez@hotmail.com).

§Autora para correspondencia: adriana.gutierrezdz@uanl.edu.mx.

Resumen

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es uno de los principales cultivos que se producen en el mundo, México es el sexto productor a nivel mundial, mientras que San Luis Potosí ocupa el tercer lugar en producción a nivel nacional. Se recolectaron plantas de caña de azúcar con síntomas de marchitez semejantes a los originados por la enfermedad de pokkah boeng en campos cañeros de la Huasteca Potosina. Esta enfermedad conocida como cogollo retorcido, es causada por algunas especies del género *Fusarium* y provoca pérdidas económicas por la disminución de la calidad del cultivo cosechado. A partir de los tallos de estas plantas se obtuvieron dos aislados de hongos con características morfológicas típicas de *Fusarium* sp. La identificación de los aislamientos se realizó a través de las características morfológicas de los macroconidios, microconidios y las características de la colonia. La identificación molecular de la especie se llevó a cabo mediante la secuenciación de las regiones de los genes ITS, β -tubulina (BT) y factor de elongación (TEF). Se cumplieron los postulados de Koch para los aislamientos obtenidos mediante inoculación en las variedades de caña de azúcar My 55 y Mex 79-431. La caracterización morfo-molecular de los aislamientos identificó a *Fusarium sacchari* como el agente causal de la enfermedad. Hasta donde se sabe, este es el primer informe de *Fusarium sacchari* como agente causal de la enfermedad de pokkah boeng en caña de azúcar en la región de la Huasteca Potosina.

Palabras clave: *Saccharum officinarum*, *Fusarium sacchari*, cogollo retorcido.

Recibido: septiembre de 2022

Aceptado: octubre de 2022

Saccharum officinarum es una de las principales plantas cultivadas en el mundo. México es el sexto productor a nivel mundial (FAO, 2022). En el año 2020 se cosecharon 774 954 ha de las cuales 69 626 correspondieron al estado de San Luis Potosí (SIAP, 2021). Los campos cañeros se encuentran distribuidos en 15 entidades federativas, siendo San Luis Potosí el tercer estado de mayor producción con una participación de 9% de la superficie cultivada del total nacional, la región productora de este cultivo se ubica en la Huasteca Potosina, en esta región, Tamasopo cuenta con 12% de la superficie estatal cultivada (Arcudia *et al.*, 2018).

El rendimiento de este cultivo es afectado por enfermedades como la de pokkah boeng o enfermedad del cogollo retorcido, en donde el patógeno penetra el tejido de la planta a través de orificios naturales o lesiones presentes ocasionando una infección caracterizada por la aparición de manchas cloróticas hacia la base de las hojas jóvenes. En los casos agudos, la infección continúa bajando por la hoja y penetra por el punto de crecimiento del tallo provocando su distorsión y presentando lesiones externas e internas parecidas a cortes, en la etapa tardía de la infección las hojas se deforman, en su base las hojas se arrugan, tuercen y pudren, aparecen manchas y rayas rojizas, en la última etapa el punto de crecimiento de la planta se pudre y esta muere (Wishwakarma *et al.*, 2013; Jeyakumar y Zhang, 2020).

La enfermedad afecta a casi todas las variedades de caña de azúcar (Wishwakarma *et al.*, 2013), provoca la reducción de los niveles de macro y micronutrientes en el tallo y las hojas enfermas, afecta el peso, el desarrollo de los entrenudos y la acumulación de azúcares en el jugo (Singh *et al.*, 2006), lo que causa la disminución de la calidad del cultivo cosechado (Dohare *et al.*, 2003) y por consiguiente del jugo de sacarosa que se utiliza para la producción del azúcar y otras materias primas.

La enfermedad del pokkah boeng es causada por *Fusarium*, existiendo controversia acerca de las especies involucradas (Jeyakumar y Zhang, 2020). *F. moniliforme* var. *subglutinans* fue reportada por Govender *et al.* (2010) en Malasia y Patil *et al.* (2007) en India. En Asia, *F. sacchari* fue reportada por Bourne en 1953 (Jeyakumar y Zhang, 2020). De acuerdo con O'Reilly (1998), *Fusarium* causa dos enfermedades diferentes, una en tallo y otra en hojas, *F. sacchari* y *F. verticillioides* son las especies causales, respectivamente.

En la Huasteca Potosina, las plantas de caña de azúcar presentan síntomas característicos de pokkah boeng en hojas y tallos, con afectación severa de los haces vasculares caracterizada por el desarrollo de coloración rojiza que se extiende a lo largo del tallo dando lugar a la muerte de la planta por marchitez; sin embargo, la etiología de esta patología se desconoce, por lo que el objetivo de este estudio fue determinar el agente causal de esta enfermedad presente en la región productora de caña de azúcar en el municipio de Tamasopo, San Luis Potosí, México.

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agrobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. El material vegetal con síntomas de pokkah boeng fue colectado en dos muestreos estratificados en zigzag en febrero y abril de 2019 en la Huasteca Potosina, en el área de El Aguacate en el ejido de Damián Carmona en Tamasopo, San Luis Potosí.

Se tomaron muestras en nueve campos cañeros, recolectando cuatro plantas de un metro de altura por punto de muestreo. De los tallos de las plantas se seccionaron fragmentos de tejido sintomático de 2 cm de longitud para la obtención de los aislados; previa desinfección con hipoclorito de sodio 2% y enjuague con agua destilada estéril, se obtuvieron muestras de 2-3 mm² de los fragmentos para su siembra en placas Petri con medio papa-dextrosa-agar (PDA) acidificado con ácido tartárico 10%. Las placas se incubaron a 25 °C durante siete días en condiciones de oscuridad.

Cultivos monospóricos de los aislados (H1, primer muestreo y H2, segundo muestreo) se obtuvieron mediante la técnica de rayado en placa a partir de diluciones de soluciones de esporas. La caracterización morfológica se basó en las características macroscópicas (color y pigmentación de la colonia) y microscópicas (conidios, fiálides e hifas) de colonias crecidas por siete días en medio PDA a 25 °C en condiciones de oscuridad. Las estructuras fúngicas se montaron con lactofenol en portaobjetos para examinarse con un microscopio de luz compuesta con aumentos de 40x y 100x (Marques *et al.*, 2013).

Para la identificación molecular de los aislados se amplificaron las regiones internal transcriber spacer, espacio transcrito interno (ITS), translation elongation factor, factor de elongación (TEF) y β -Tubulin, beta-tubulina (BT), previa extracción de ADN (Cenis, 1992) de colonias monospóricas. Los iniciadores utilizados para las amplificaciones fueron: ITS4/ITS5 (White *et al.*, 1990), TEF1 α /TEF2 (Carbone y Kohn, 1999) y BT3/BT5 (Chala *et al.*, 2019). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 12.5 μ l conteniendo buffer *Taq* 1X, MgCl₂ 2.5 mM, dNTPs 0.2 mM, iniciadores 0.2 pM cada uno, *Taq* polimerasa 0.25 U y ADN 10 ng. El programa térmico utilizado fue el reportado por Chala *et al.* (2019) con temperaturas de alineación de 52 °C para ITS y TEF y 60 °C para BT.

Los fragmentos amplificados se enviaron a secuenciación bidireccional a Macrogen (Seúl, Corea del Sur). En la edición de secuencias y obtención de secuencias consenso se utilizaron los programas Chromas Lite v2.6.1. y Reverse Complement (Stothard, 2000), respectivamente, el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) se utilizó para la comparación con las secuencias nucleotídicas del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Para realizar las pruebas de patogenicidad, fueron inoculados tallos de caña de azúcar de 25 cm de largo de las variedades Mex 79-431 y M55-14 con 10 μ l de suspensión de esporas 1×10^6 ml⁻¹ de ambos aislados, a 2 cm por arriba y por debajo del entrenudo. Se evaluaron seis tratamientos con ocho repeticiones: T1) Mex 79-43-H1; T2) Mex 79-431.H2; T3) Mex 79-431.agua destilada; T4) My 55-14.H1; T5) My 55-14.H2; T6) My 55-14.agua destilada, se utilizó un tallo por repetición. Los tallos inoculados se incubaron en cámara húmeda por 24 h y previo retiro de la cubierta de la cámara se incubaron por siete días más, en ambos casos a temperatura ambiente (≈ 25 °C). El re-aislamiento del patógeno de los tallos inoculados con síntomas de enfermedad se realizó en placas con medio PDA adicionado con sulfato de estreptomicina 0.05 mg ml⁻¹.

Las colonias de los cultivos monospóricos H1 y H2 obtenidas del material colectado, así como de los re-aislados de los tallos inoculados, presentaron coloración púrpura-violeta (Figura 1A) y coloración rosácea (Figura 1B), respectivamente. El crecimiento micelial de las colonias fue abundante, de consistencia afelpada y coloración inicial pálida que se tornó violeta con el tiempo.

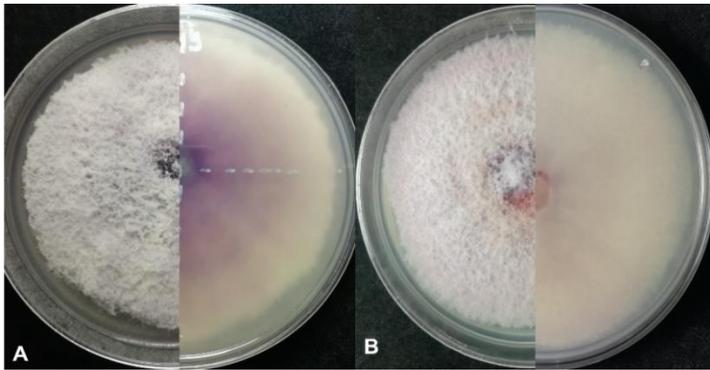


Figura 1. Cultivos monospóricos de *Fusarium sacchari* obtenidos de tallos de caña de azúcar con síntomas de pokkah boeng después de siete días de incubación. A) H1 y B) H2.

Los microconidios presentaron forma ovalada y sin septos, los macroconidios presentaron forma alargada con uno o dos septos (Figura 2A-C), se observó la formación de microconidios que se produjeron abundantemente en las falsas cabezas de los monofilidos y también de los polifílicos (Figura 2F). Estas características presentadas por H1 y H2, corresponden con las descritas por (Leslie y Summerell, 2006; Nordahliawate *et al.*, 2008) para aislados de *Fusarium sacchari*.

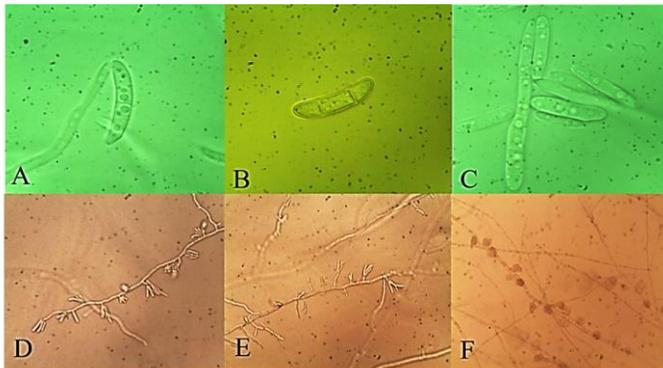


Figura 2. *Fusarium*. A-C) microconidios y macroconidios; D, E) hifas; y F) falsas cabezas.

La comparación de las secuencias amplificadas ITS (485 pb), TEF (641 pb) y BT (339 pb) mostró 99% de identidad con secuencias del NCBI de *F. sacchari* (ITS: MF063030.1; TEF: MT010988.1; BT: MT011039.1), especie identificada como agente causal de pokkah boeng (Leslie y Summerell, 2006; Nordahliawate *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2014; Viswanathan *et al.*, 2017; Zhang y Jeyakumar, 2018).

Ambos aislados indujeron los síntomas característicos de la enfermedad de pokkah boeng en los tallos de caña de azúcar inoculados con los tratamientos T1, T2, T4 y T5 después de siete días (Figura 3A), mientras que los tallos inoculados con los tratamientos testigo (T3 y T6) permanecieron asintomáticos. A partir de la inoculación de los tallos se realizó el re-aislamiento del hongo y su identificación morfológica, cumpliendo con los postulados de Koch.

La variedad Mex 79-431 presentó síntomas y signos característicos de la enfermedad visualmente menos severos que los presentados por la variedad My 55-14 (Figura 3B-C); Mex 79-431 es una de las variedades de caña de azúcar que se cultivan en la Huasteca Potosina (Arcudia *et al.*, 2018), con adaptación a diferentes condiciones de suelo, clima y manejo de la región cañera (López, 2005), lo que permite suponer que debido a que el aislado de *F. sacchari* es originario de esta zona, Mex 79-431 puede presentar resistencia al patógeno.

La variedad My 55-14 presentó coloración café rojizo tanto en el entrenudo como en el resto del tallo, tornándose negro el centro de la lesión, color característico del tejido necrótico, la coloración de los bordes fue marrón (Figura 3D-E), malformaciones del tallo y brotación de yemas laterales se produjeron también.

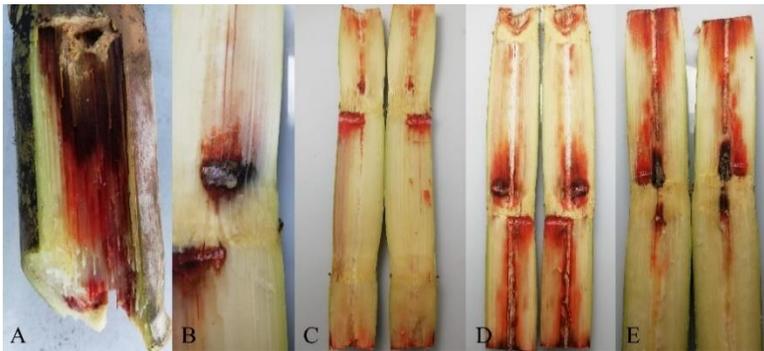


Figura 3. Síntomas presentados en tallos de caña de azúcar a los ocho días de la inoculación con *Fusarium sacchari*. A) tallo recolectado en campo; B, C) tallos de la variedad Mex 79-431; D, E) tallos de la variedad My 55-14.

Los síntomas presentados por las plantas en campo, así como los presentados por los tallos inoculados en laboratorio, coinciden con lo reportado por Nordahliawate *et al.* (2008); Wishwakarma *et al.* (2013) para la enfermedad de pokkah boeng causada por *F. sacchari*. De acuerdo con Nordahliawate *et al.* (2008), sólo *F. sacchari* causa la enfermedad de pokkah boeng, otras especies como *F. proliferation* y *F. subglutinans* no son patogénicas para el cultivo de caña de azúcar; sin embargo, las especies de *F. proliferation* y *F. verticillioides* se reportaron como agentes causales del pokkah boeng en caña de azúcar en Veracruz (Rosas-Guevara *et al.*, 2014). *F. sacchari*, *F. proliferation* y *F. verticillioides* han sido aisladas de raíces de caña de azúcar con síntomas de marchitez en Morelos (Martínez-Fernández *et al.*, 2015).

La enfermedad de pokkah boeng se convierte en problema después del estrés de la planta (Zhang y Jeyakumar, 2018). *F. sacchari* crece en material vegetal en descomposición produciendo gran cantidad de conidios que se propagan por viento y lluvia, las esporas colonizan las hojas, flores y tallos de las plantas, la forma curvada de los macroconidios de las especies de *Fusarium* facilita su dispersión por la lluvia (Jeyakumar y Zhang, 2020), por tanto, existe el riesgo de que la presencia del hongo en el suelo o bien en la semilla pueda contaminar las nuevas plantaciones. Las variedades de caña de azúcar cultivadas en México no muestran tolerancia a la enfermedad (Rosas *et al.*, 2014), la fase en que se encuentra el cultivo, así como el clima de las zonas dónde se desarrolla, son decisivos para que se presente con severidad (Viswanathan *et al.*, 2017). Aunque no se han reportado daños económicos de importancia en el cultivo en México por pokkah boeng, deben

tomarse medidas preventivas, la búsqueda y utilización de variedades resistentes, así como de semilla certificada o libre del patógeno y la adopción de medidas integrales, tienen que adoptarse como necesarias para la producción de caña de azúcar libre de la enfermedad.

Conclusiones

El agente causal de la enfermedad de pokkah boeng en caña de azúcar en la región de la Huasteca Potosina es *Fusarium sacchari*. El patógeno aislado de los tallos con síntomas de la enfermedad reprodujo los síntomas en las plantas sanas inoculadas, la identificación molecular de los aislados permitió la definición de la especie. Este es el primer reporte de la presencia de la enfermedad en campos cañeros de esta región y de la identificación de su agente causal.

Literatura citada

- Arcudia, C. E.; Flores, H.; Orta, S. B. y Torres, B. 2018. Agricultura industrial en la Huasteca Potosina: la caña de azúcar. México. Tlatemoani: Rev. Académica de la Investigación. 9(27):131-146.
- Carbone, I. and Kohn, L. M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*. United States. 91(3):553-556.
- Cenis, J. L. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic acids research*. United Kingdom. 20(9):2380. Doi:10.1093/nar/20.9.2380.
- Chala, A.; Degefu, T. and Bente, B. M. 2019. Phylogenetically diverse *Fusarium* species associated with sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) and finger Millet (*Eleusine coracana* L. Gaertn) grains from Ethiopia. *Diversity*. Switzerland. 11(93):1-11. Doi:10.3390/d11060093.
- Dohare, S.; Mishra, M. M. and Kumar, B. 2003. Effect of wild on juice quality of sugarcane. *Annals of Biology*. India. 19(2):183-186.
- FAO. 2022. Food and Agriculture Organization of the United States. FAOSTAT. División de Estadística. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>.
- Govender, P.; McFarlane, S. A. and Rutherford, S. R. 2010. *Fusarium* species causing pokkah boeng and their effect on *Eldana saccharina* walker (Lepidoptera: Pyralidae). In: Proceedings South Africa Sugar Technologists Association. 83rd. SASTA Congress. South African Sugar Technologists Association. Durban, South Africa. 267-270 pp.
- Jeyakumar, J. M. J. and Zhang, M. 2020. Symptoms and their assessment of sugarcane pokkah boeng. *Int. J. Environ. Agric. Res.* United States of America. 6(12):50-54. https://ijoear.com/assets/articles_menuscripts/file/IJOEAR-DEC-2020-15.pdf.
- Leslie, J. F. and Summerell, B. A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing. First (Ed.). Ames, Iowa, United States of America. 240-241 pp.
- Lin, Z. X. S.; Que, Y.; Wang, J.; Comstock, J. C.; Wei, J.; McCord, P. H.; Chen, B.; Chen, R. and Zhang, M. 2014. Species-specific detection and identification of *Fusarium* species complex, the causal agent of sugarcane pokkah boeng in China. *PLoS One*. 9(8):e104195. doi:10.1371/journal.pone.0104195.
- López, E. 2005. Variedades promisorias de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) para la Huasteca Potosina. Fundación Produce de San Luis Potosí, AC. San Luis Potosí, SLP. México. Folleto núm. 1. 34 p.
- Marques, J. P. R.; Soares, M. K. M. and Appezzato, G. B. 2013. New staining technique for fungal-infected plant tissues. *Turkish J. Bot.* 37(4):1-4. Doi:10.3906/bot-1204-9.

- Martínez, F. E.; Martínez, J. P.; Guillén, D.; Peña, Ch. G. y Hernández, H. V. M. 2015. Diversidad de *Fusarium* en las raíces de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en el estado de Morelos, México. Rev. Mex. Micol. 42:33-43. <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci.arttext&pid=S0187-31802015000200006>.
- Nordahliawate, M. S.; Nur Ain Izzati, M. Z.; Azmi, A. R. and Salleh, B. 2008. Distribution, morphological characterization and pathogenicity of *Fusarium sacchari* associated with pokkah boeng disease of Sugarcane in Peninsular Malaysia. Pertanika J. Trop. Agric. Sci. Malaysia. 31(2):279-286. <https://core.ac.uk/download/pdf/153798779.pdf>.
- O'Reilly, G. 1998. The South African sugar industry. United Kingdom. Int. Sugar J. 100:266-268.
- Patil, A. S.; Singh, H.; Sharma, S. R. and Rao, G. 2007. Morphology and pathogenicity of isolates of *Fusarium moniliforme* causing pokkah boeng disease of sugarcane in Maharashtra. In: microbial diversity: modern trends. Ram, R. C. and Sinha, A. (Ed.). Daya Delhi Ed. New Delhi, India. 234-263 pp.
- Rosas, G. V.; Hernández, A. M.; Miranda, M. R.; Bravo, M. E. y Berriozabal, O. A. 2014. Identificación y variabilidad morfológica de pokkah boeng (*Fusarium* spp.) en caña de azúcar. Investigación Agropecuaria. México. 11(2):119-126. <https://investigacionagropecuaria.jimdofree.com/art%C3%ADculos-11-2/>.
- SIAP. Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2021. Anuario estadístico de producción agrícola. Cierre de la producción agrícola. <https://nube.siap.gob.mx/cierre-agricola/>.
- Singh, A.; Chauhan, S. S.; Singh, A. and Singh, S. B. 2006. Deterioration in sugarcane due to pokkah boeng disease. Sugar Tech. India. 8(2-3):187-190. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02943659>.
- Stothard, P. 2000. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. BioTechniques 28(6):1102-1104. Doi: 10.2144/00286ir01.
- Viswanathan, R.; Balaji, C. G.; Selvakumar, R.; Malathi, P.; Ramesh, S. S. A.; Naveen, P. C.; Chhabra, M. L. and Parameswari, B. 2017. Epidemiology of *Fusarium* diseases in sugarcane: a new discovery of same *Fusarium sacchari* causing two distinct diseases, wilt and pokkah boeng. Sugar Tech. India. 19(6):638-646. Doi: 10.1007/s12355-017-0552-4.
- 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. and White, T. J. (Ed.). Academic Press. California, USA. 315-322 pp. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>.
- Wishwakarma, S. K.; Kumar, P.; Nigam, A.; Singh, A. and Kumar, A. 2013. Pokkah boeng: an emerging disease of sugarcane. J. Plant Pathol. Microbiol. Brussels, Belgium. 4(3):1000170. Doi: 10.4172/2157-7471.1000170.
- Zhang, M. and Jeyakumar, J. M. J. 2018. *Fusarium* species complex causing pokkah boeng in China. In: *Fusarium*: plant diseases, pathogen diversity, genetic diversity, resistance and molecular markers. Askun, T. (Ed.). IntechOpen. United Kingdom. 139-154 pp. Doi: 10.5772/intechopen.73133.