

IDENTIFICACIÓN Y VARIABILIDAD MORFOLÓGICA DE POKKAH BOENG (*Fusarium* spp) EN CAÑA DE AZÚCAR, EN MÉXICO

IDENTIFICATION AND MORPHOLOGICAL VARIABILITY OF POKKAH BOENG (*Fusarium* spp) ON SUGAR CANE, IN MEXICO

Victoria Rosas-Guevara¹, Marianguadalupe Hernández-Arenas^{2*}, Rogelio Miranda-Marini³, Ernesto Bravo-Mosqueda⁴, Adilene Berriozabal-Onofre²

¹Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. Carr. México-Texcoco km 38.5, C.P. 56230, Chapingo, Edo. de México. México. Correo-e: vickyskarsa@hotmail.com

²INIFAP, Campo Experimental Zacatepec. Carr. Zacatepec-Galeana, km. 0.5, C.P. 62780, Zacatepec, Morelos, México. Teléfono: 01 (734) 3430230 ext. 116. Correo-e: hernandez.marian@inifap.gob.mx

³INIFAP. Campo Experimental Cotaxtla. Km 34.5 Carr. Veracruz-Córdoba, Col. Medellín de Bravo C.P. 94270, Veracruz, Veracruz, México. Correo-e: miranda.rogelio@inifap.gob.mx

⁴INIFAP, Campo Experimental Valles Centrales de Oaxaca. Melchor Ocampo No. 7, Santo Domingo Barrio Bajo Villa De Etlá C.P. 68200, Oaxaca, Oaxaca, México. Correo-e: bravo.ernesto@inifap.gob.mx

*Autor para correspondencia.

RESUMEN

El pokkah boeng o “cogollo retorcido” es una de las enfermedades fungosas más frecuentes en caña de azúcar. Con el objetivo de aislar e identificar morfológicamente las especies de *Fusarium* spp causantes del pokkah boeng en los estados de Puebla, Morelos, Oaxaca y Veracruz, en México, se realizaron colectas de tejido enfermo de caña de azúcar; trozos de 5 mm fueron lavados y sembrados en medio de cultivo PDA y se incubaron a 25 ± 1°C. Tres días después, los crecimientos de hongos se purificaron por la técnica de punta

de hifa y se obtuvieron cultivos monospóricos. La descripción cultural de los aislados se realizó a partir de los cultivos monospóricos de cada aislado en medio PDA y la caracterización de macro y microconidios se realizó en medio CLA (Agar Hoja de Clavel). En las plantas enfermas colectadas, se observó una alta variabilidad en los síntomas observados coincidentes a lo reportado en la literatura. En total, se obtuvieron 70 aislados analizados en este estudio, de los cuales 95.7% corresponden a *F. proliferatum* y 4.3% a *F. verticillioides*. Las especies de *Fusarium* asociadas a pokkah boeng de la caña de azúcar en Veracruz,

Morelos, Oaxaca y Puebla fueron *F. proliferatum* y *F. verticillioides*.

Palabras clave: *Saccharum officinarum*, incidencia, cogollo retorcido.

ABSTRACT

The pokkah boeng or top rot is one of the most common fungal diseases in sugarcane. The aim was to identify morphologically *Fusarium* spp species causing pokkah boeng in Puebla, Morelos, Oaxaca and Veracruz states, in Mexico. Collections of diseased tissue of sugarcane were conduct; 5 mm pieces were wash, grown in PDA medium and incubated at 25 ± 1 °C. Three days later, the fungi were purify by hyphal tip technique and monoconidial cultures were obtain. Cultural description of the isolates from the spore cultures of each isolate on PDA medium and characterization of macro and microconidia was in CLA (Carnation Leaf Agar) was perform. In diseased plants collected, a high variability was observed in the symptoms observed coincident to those reported in the literature. In total, 70 isolates were analyze in this study, of which 95.7% were *F. proliferatum* and *F. verticillioides* to 4.3% were obtain. *Fusarium* species associated with sugar cane pokkah boeng on Veracruz, Morelos, Oaxaca and Puebla were *F. verticillioides* and *F. proliferatum*.

Keywords: *Saccharum officinarum*, incidence, top rot.

INTRODUCCIÓN

En México, la industria azucarera es una de las más importantes, debido a su relevancia económica y social en el campo. Actualmente, genera más de dos millones de empleos, tanto en forma directa como indirecta y se desarrolla en 15 entidades federativas y 227 municipios con un valor de la producción de 30 mil millones de pesos (SAGARPA, 2013).

En caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), como en otros cultivos, las enfermedades representan factores limitantes a la producción. Las enfermedades deben ser oportuna y eficientemente identificadas y diagnosticadas para su eficiente control (Chavarría, 2006).

Entre las enfermedades foliares, el pokkah boeng o cogollo retorcido es una de las enfermedades fungosas más frecuentes y está prácticamente en todas las áreas productoras de caña de azúcar del mundo (Raid, 2012). Puede causar graves pérdidas en variedades comerciales susceptibles con un rango de incidencia que oscila del 1-90% (Vishwakarma et al., 2013).

Esta enfermedad fue descrita originalmente en Java e India (Raid, 2012). Se reportó por primera vez en Java por Walker en 1886, más tarde por Edgerton en 1955 y por Martin et al. en 1961 (VSI, 2013).

Numerosos autores han descrito esta enfermedad (López et al., 1998; Rott et al., 2000; Raid, 2012). Se ha reportado a: *Giberella fujikuroi* (Sawada) H.W. Wollonweber; anamórfo *Fusarium verticillioides* (Nirenberg) [sin. *F. moniliforme* (Shledon)] y a *Giberella subglutinans* (Edwards) P.E. Nelson, T.A. Tousson y Marasas; anamórfo *Fusarium subglutinans* (H. W. Wollenweber y a O. A. Reiking) P.E. Nelson, T. A. Tousson y Marassas, como los causantes de esta enfermedad.

El pokkah boeng se convirtió en una enfermedad importante de caña de azúcar en Java con la propagación de la variedad comercial POJ 2878 y se investigó extensamente en ese país por Bolle durante 1927-1937 (VSI, 2013).

Los primeros síntomas de la enfermedad son áreas cloróticas en la base de las hojas jóvenes, distorsión (arrugamiento y enrollamiento) y acortamiento de las hojas afectadas y en casos severos la pudrición del cogollo y

muerte del tallo (Whittle y Irawan, 2000; Raid, 2012).

Las variedades de caña de azúcar utilizadas en México no han mostrado tolerancia a ésta enfermedad que adquiere cada vez más importancia en nuestro país debido a los daños ocasionados.

Actualmente, no se realiza ningún tipo de control para esta enfermedad. Por otro lado, debido a que es del tipo sistémico, el uso de semilla contaminada de caña de azúcar con estos patógenos puede infectar las nuevas siembras y suelos. Dada la importancia de este patógeno y al escaso conocimiento que existe en Morelos sobre ella, se planteó la presente investigación con el objetivo de aislar e identificar morfológicamente las especies de *Fusarium* spp, asociadas a la enfermedad del pokkah boeng en Puebla, Morelos, Oaxaca y Veracruz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de muestras

En el periodo de enero a diciembre de 2012, se realizaron una serie de colectas de hojas de caña de azúcar con síntomas de pokkah boeng en parcelas comerciales en el estado de Morelos. Cada punto de muestreo se geo-referenció con un GPS (Garmin®, Etrex Legend Hcx). Las muestras, se colocaron en bolsas de polietileno debidamente etiquetadas para su fácil identificación y se transportaron en una hielera al Laboratorio de Sanidad Vegetal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en Zacatepec, Morelos.

Aislamiento

A partir de tejidos de caña de azúcar con síntomas típicos de pokkah boeng, se cortaron trozos de la zona de transición entre tejido sano y enfermo, se lavaron y desinfectaron en una solución de hipoclorito

de sodio (NaClO) al 3% por tres minutos y se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces consecutivas; posteriormente se colocaron sobre papel absorbente estéril para su secado. Finalmente, se colocaron cinco trozos de tejido en medio de cultivo PDA y se incubaron a 25 ± 1 °C.

Tres días después, los crecimientos de hongos se purificaron por la técnica de punta de hifa en una nueva caja de Petri con PDA, las cuales se incubaron a 25 ± 1 °C hasta que se observó la presencia de macroconidios (10-15 días después). Se obtuvieron cultivos monospóricos mediante diluciones de solución madre de conidios hasta obtener una concentración de 1×10^3 conidios mL⁻¹ contabilizando con una cámara de Neubauer. Posteriormente, se depositó una gota de la última dilución en medio PDA, distribuyéndola homogéneamente en la superficie con ayuda de una varilla de vidrio, y se incubó a 25 ± 1 °C. A los tres días se seleccionó un conidio individual germinado de cada aislado y se transfirió para su incremento a una caja de Petri con medio PDA manteniéndola en incubación.

Caracterización cultural

La descripción cultural de los aislados se realizó a partir de los cultivos monospóricos de cada aislado en medio PDA, ya que este es el medio reportado como el más adecuado para observar estas características según López y López (2000) y Leslie y Summerell (2006). Se incubaron a temperatura ambiente (26 ± 1 °C) por 30 días con alternancia de 12 horas luz/oscuridad natural. Se evaluaron características de la colonia como son: crecimiento radial promedio por día (cm/día) y pigmentación.

Caracterización morfológica

Para la observación y análisis de las características macroscópicas de *Fusarium* spp, se empleó el medio CLA (Agar Hoja de Clavel) de acuerdo a la metodología de López y López (2000) y Leslie y Summerell (2006).

Para preparar el medio de cultivo CLA, se cortaron trozos de 5 mm² de hojas de clavel, las cuales se empaquetaron en aluminio y se secaron en estufa a 70 ± 1 °C por 3 horas con 30 minutos. Una vez secas se enviaron al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) para esterilizar con irradiación gama (2.5 megarads).

Este medio se preparó de la siguiente forma: agua agar al 2% (20 gramos de agar en 1000 mL de agua destilada estéril) y se colocaron de 10 a 12 piezas de hojas de clavel estériles por caja de Petri. Posteriormente, cada aislado monospórico, se transfirió a una caja de Petri con medio de cultivo CLA que se incubaron a temperatura ambiente (26 ± 1 °C) por 20 días. Al vigésimo día se realizaron las preparaciones para observar las variantes morfológicas correspondientes.

Preparaciones semipermanentes con lactofenol se prepararon para la caracterización de conidios. En un microscopio compuesto (Nikon SMZ800®, EE.UU) con cámara digital instalada y usando el objetivo de 40X, se tomaron 20 fotografías para realizar la caracterización cualitativa (forma) y cuantitativa (largo por ancho) de 25 macroconidios y 25 microconidios de cada aislado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las plantas enfermas colectadas, se observó una alta variabilidad en los síntomas observados, sin embargo, de modo general se pueden describir de la siguiente forma: la base de las hojas afectadas es frecuentemente más estrecha que la de las hojas sanas (Figura 1A). En las hojas maduras, dentro de las partes cloróticas, se desarrollan manchas y líneas irregulares rojizas. En las áreas rojizas a veces se desarrollan orificios que no tienen arreglo definido. Este tejido rojizo puede formar lesiones “escalera”, frecuentemente con

cortes oscuros. Las nervaduras de las hojas también pueden llegar a estar cloróticas y desarrollar áreas irregulares necróticas de color rojizo. La infección del cogollo descende dentro del tallo con líneas café rojizas y se pueden encontrar largas y severas depresiones en los entrenudos mezcladas con lesiones que dan la apariencia de corte de cuchillo. Estas lesiones a veces atraviesan la corteza causando curvatura y distorsión del tallo. Los síntomas observados coinciden con la descripción realizada por diferentes autores (Whittle y Irawan, 2000; Rott *et al.*, 2000; Raid, 2012).

En total, se obtuvieron 70 aislados analizados en este estudio, de los cuales un 95.7% presentaron colonias con abundante micelio aéreo de blanco a púrpura (Figuras 2A-D) y con pigmentación variable desde blanco hasta rojo oscuro (Figuras 2E-H), características que coincidieron con lo reportado por Leslie y Summerell (2006), en la descripción de *F. proliferatum* en medio de cultivo PDA. El crecimiento micelial radial fue de 0.43-1.1 cm día⁻¹ similar a lo mencionado por Jahan *et al.* (2013) para el caso de *F. proliferatum*.

Con respecto al crecimiento de los 67 aislados en medio de cultivo CLA, únicamente 20 (29.8%) esporularon y formaron microconidios no septados (Figura 2J) de 6.1-15.3 × 1.5-3.1 μm en falsas cabezas (Figuras 2K y 2L); macroconidios con célula apical curvada y célula basal en forma de pie, de 21.6-60.1 × 1.8-4.6 μm, de 3-5 septos transversales (Figura 2I); clamidosporas ausentes como lo mencionaron Pavlovic *et al.* (2009) para *F. proliferatum*.

El 4.3% de los aislamientos presentaron las siguientes características en medio de cultivo PDA: micelio blanco, violeta y hasta púrpura (Figuras 3 A-C), pigmentación de naranja a casi negro (Figuras 3 D-F) como lo señalado por Leslie y Summerell (2006) para *F. verticillioides*.



Figura 1. Síntomas de pokkah boeng. A) área cloróticas en base de hojas jóvenes y base estrecha; B) acortamiento de las hojas afectadas; y C) distorsión (arrugamiento y enrollamiento) de hojas afectadas y “pudrición de punta”.

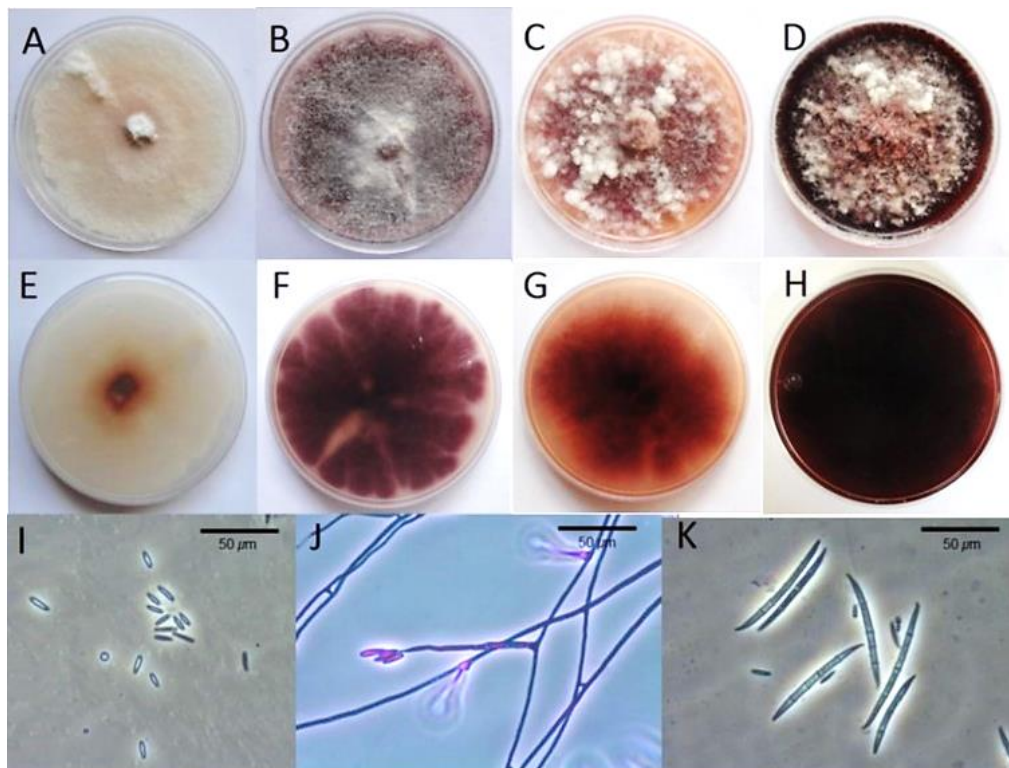


Figura 2. *Fusarium proliferatum*. Variabilidad en el tipo de micelio (2A-D) y pigmentación (2E-H); microconidios (2I); falsas cabezas (2J) y macroconidios (2K).

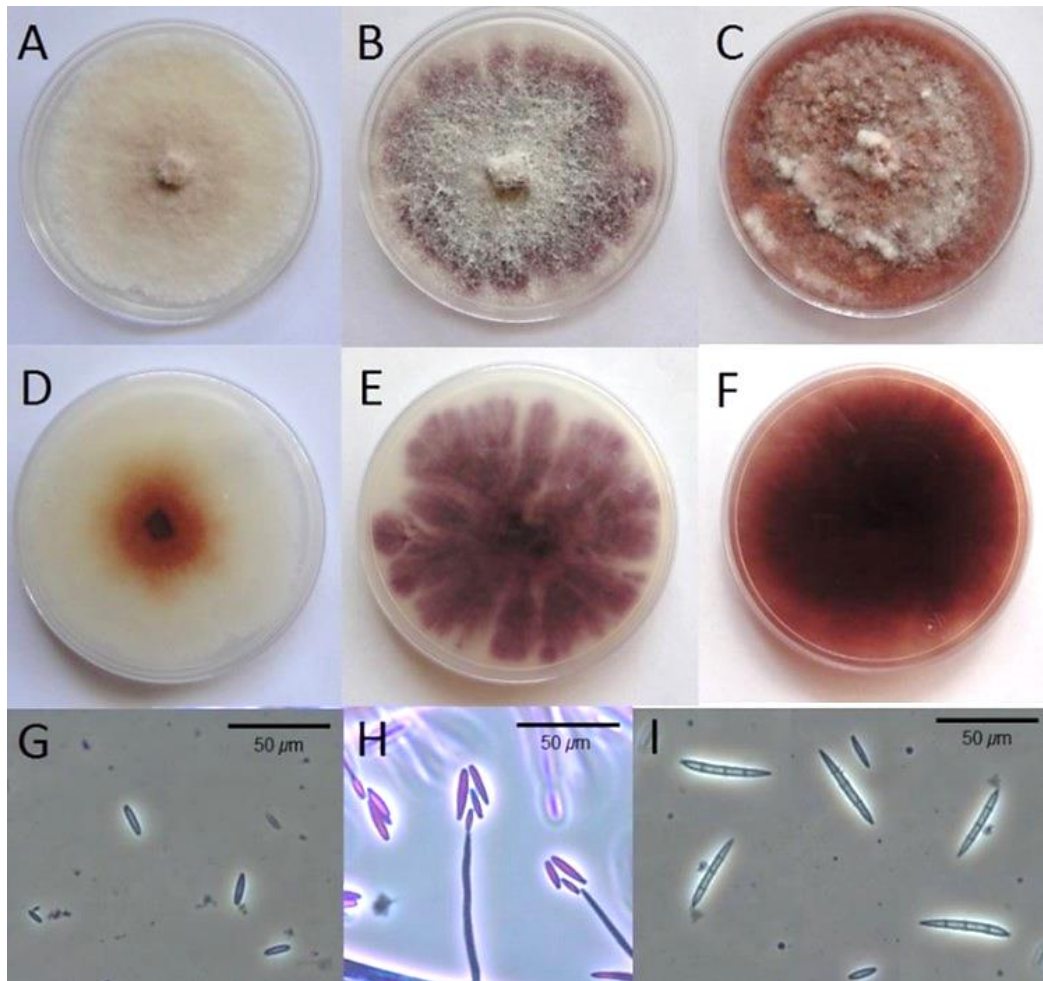


Figura 3. *Fusarium verticillioides*. Variación de micelio (3A-C) y de pigmentación (3D-F); microconidios (3G); falsas cabezas (3H) y macroconidios (3I).

Por otro lado, el crecimiento micelial radial fue de $0.66-0.9 \text{ cm día}^{-1}$ al igual que lo reportado por Hirata *et al.* (2001) para la misma especie. Además, produjeron microconidios sin septos (Figura 3G), en monofialides (Figura 3H), de $6.7-19.0 \times 1.4-4.8 \mu\text{m}$; macroconidios (Figura 3I) de 3 septos transversales, con célula apical ligeramente curvada y célula basal en forma de pie (Figura 3K) de $24.2-31.8 \times 2.0-3.1 \mu\text{m}$; clamidosporas ausentes.

Las especies del género *Fusarium* asociadas a plantas de caña de azúcar con síntomas de pokkah boeng en las regiones

productoras de Veracruz, Morelos, Oaxaca y Puebla fueron *F. proliferatum* y *F. verticillioides*. Ambas especies ya han sido reportadas como patógenos de la caña de azúcar (Rott *et al.*, 2000; Whittle y Irawan, 2000; Raid, 2012).

En el estado de Morelos se encontraron las dos especies de *Fusarium*, mientras que en Puebla, Oaxaca y Veracruz, se identificó únicamente a *F. verticillioides*. Asimismo, la especie más frecuentemente aislada en las regiones productoras de caña de azúcar en México fue *F. proliferatum* (95.7%) lo cual se contrapone a lo reportado

por López y López (2000) y Mohammadi *et al.* (2012) quienes reportaron a *F. verticilloides* como la especie predominantemente aislada de caña de azúcar con síntomas de pokkah boeng en Cuba e Irán, respectivamente.

CONCLUSIONES

En este estudio se aisló e identificó a *F. proliferatum* y *F. verticilloides* como las especies presentes en síntomas de pokkah boeng en las zonas productoras de caña de azúcar en Veracruz, Oaxaca, Puebla y Morelos, México.

La especie más frecuentemente aislada en las regiones productoras de caña de azúcar en México fue *F. proliferatum* con frecuencia de 95.7%.

La especie que presentó mayor variabilidad morfológica y cultural fue *F. proliferatum*.

LITERATURA CITADA

Chavarría, S. E. 2006. Escalas descriptivas para la evaluación de enfermedades de la caña de azúcar. LAICA (Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar). San José, Costa Rica. 53 pp.

Hirata, T., E. Kimishima, T. Aoki, I. H. Nirenberg and C. Donnell. 2001. Morphological and molecular characterization of *Fusarium verticillioides* from rotten banana imported into Japan. *Mycoscience* 42: 155-166.

Jahan Q., A. Shireen, S. Meon, H. Jaafar and Z. A. Ahmad. 2013. *Fusarium proliferatum* through species specific primers and its virulence on rice seeds. *International journal of agriculture and biology* 15(4): 650-656.

Leslie, J. F. and B. A. Sumerell. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell

Publishing Professional 2121 State Avenue, Ames, Iowa, 50014, USA.

López, M. O.; I. Sandoval y J. Mena. 1998. Manual para la identificación de los hongos fitopatógenos de la caña de azúcar en Cuba. INISAV, La Habana, Cuba. 75 pp.

López D. y O. M. López. 2000. Estudio del efecto inhibitorio de *Fusarium moniliforme* Sheldon sobre la germinación de la semilla agámica de la caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrida). *Fitosanidad* 4: 1-2.

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

Pavlovic D. S., B. V. Stojšin, D. S. Stojanovic, S. M. Starovic, F. F. Bagi and B. D. Budakov. 2009. *Gibberella intermedia* the pathogen of st. john's wort, coneflower and marshmallow in Serbia. *Actas de la Sociedad Cultural Serbia de las Ciencias Naturales* 116: 191-199.

Raid R., N. 2012. Pokkah boeng disease of sugarcane. University of Florida, Florida Coop. Ext. Service, Institute of Food and Agricultural Sciences. SS-AGR-204. 2 pp.

Rott P., R. A. Bailey, J. C. Comstock, B. J. Croft, A. S. Saumtally. 2000. A guide to sugarcane diseases. CIRAD and ISSCT. France. 339 pp.

SAGARPA, 2013. Cultivos agroindustriales, Impactos de la caña. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Documentos/Cultivos%20Agroindustriales/Impactos%20Ca%C3%B1a.pdf>

Vishwakarma S. K., P. Kumar, A. Nigam, A. Singh, A. Kumar. 2013. Pokkah boeng: an emerging disease of sugarcane. *Journal Plant Pathology and Microbiology* 4: 170. <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7471.1000170>.

VSI. 2013. Vasatndada Sugar Institute. Sugarcane diseases information. Pokkah boeng. VSI, India. Consultado en: 29 octubre, 2013. Disponible en: http://www.vsisugar.com/india/agriculture_divisions/plantpathology/pokkaboengdisease-sugarcane.htm

Whittle P. and L. Irawan. 2000. Pokkah boeng. In: Rott P., Bailey R.A., Comstock J.C., Crott B.J., Saumtally A.S. (eds): A Guide to Sugarcane Diseases. pp. 136–140.