

DISTRIBUCION, INCIDENCIA Y COMPARACION FENOTIPICA DE CEPAS DE *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, CAUSANTE DEL RAQUITISMO DEL RETOÑO DE LA CAÑA DE AZUCAR EN COSTA RICA^{1/}

Luis G. Jiménez *
Bernal Fernández **

ABSTRACT

Distribution, incidence, and phenotypic comparison of isolates of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease (RSD) of sugarcane, in Costa Rica. A total of 260 cuttings of sugarcane were obtained from six regions: Filadelfia, Cañas, Grecia, San Carlos, Pérez Zeledón and Juan Viñas. The vascular juice was extracted by centrifugation of internodes and the presence of RSD bacterium was determined by phase-contrast microscopy. The pathogen was found in all regions sampled and the incidence by cultivar ranged from 0 to 77%, the highest being in cv. B-4744 from San Carlos.

One isolate of the RSD bacterium was obtained from each of the 6 regions; morphological, biochemical, and physiological tests were carried out using the appropriate media and incubating at 28 C for 22 days.

No phenotypic differences were found among Costa Rican isolates, nor between these and the type strain from the American Type Culture Collection. The host-parasite causal relationship was shown to satisfy Koch's postulates.

INTRODUCCION

El raquitismo del retoño (RR) de la caña de azúcar fue reconocido por primera vez en 1944-1945 en Queensland, Australia en la variedad Q28 (Steindl, 1961). Desde entonces, se ha informado de la ocurrencia de esta enfermedad en Kenya (Early, 1975), Estados Unidos, Brasil, Sur Africa y Japón (Davis *et al.*, 1980); Gillaspie *et al.*, 1973).

Se creía inicialmente que el agente causal era un virus, debido a la incapacidad de los investigadores de asociar la enfermedad a un microorganismo y al hecho de que el jugo vascular de plantas enfermas era capaz de retener la infectividad a través de múltiples pasajes (Steindl, 1961). Empe-

ro, secciones ultra-delgadas, transversales, de plantas enfermas, observadas al microscopio electrónico, revelaron que una bacteria estaba presente en los vasos xilemáticos atrapada en una matriz (Koike *et al.*, 1982; Weaver *et al.*, 1977).

La bacteria es un bacilo Gram positivo pleomórfico que mide de 0,2 a 0,3 µm de diámetro por 4 a 6 µm de largo. Se divide por fisión binaria transversal, presenta mesosomas y pared celular lisa (Davis *et al.*, 1980; Weaver *et al.*, 1977). Su patogenicidad fue demostrada en 1980, tras repetidos aislamientos en cultivo axénico (Davis *et al.*, 1980).

En 1984 Davis *et al.* (1984) en un trabajo sobre la taxonomía y caracterización del RR propusieron un nuevo género *Clavibacter*, para designar al agente causal del RR y bacterias corineiformes relacionadas; también propusieron la especie *xyli* y subespecie *xyli* para llamar al agente causal del RR.

No existen síntomas externos confiables para el diagnóstico del RR; en caña, el enanismo es el único síntoma externo y éste también es observado a causa de otras enfermedades, por lo que no es posible basar el diagnóstico en este tipo de

1/ Recibido para su publicación el 14 de marzo de 1986.

* Programa de Posgrado en Microbiología, Universidad de Costa Rica. Dirección actual 8312 1000 San José.

** Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

síntoma. Desde que en 1973 se asoció el RR a una bacteria corineiforme (Gillaspie *et al.*, 1973), se han desarrollado métodos de diagnóstico rápidos para determinar dicha bacteria en extractos vasculares, entre ellos la microscopía electrónica (Teakle *et al.*, 1979), el contraste de fase (Davis y Dean, 1984) y el campo oscuro (Gillaspie *et al.*, 1973).

Algunas variedades de caña y algunos pastos desarrollan síntomas internos que consisten en una decoloración vascular, usualmente rojo naranja, en los nudos maduros (Schexnayder, 1960; Steindl, 1961) o una decoloración salmón rosada debajo del área meristémica (Gillaspie *et al.*, 1966; Matsuoka, 1971; Schexnayder, 1960). Los síntomas internos en caña de azúcar (Gillaspie *et al.*, 1966; Schexnayder, 1960; Singh, 1969), pasto elefante (Matzouka, 1971), y "banagrass" (Steindl *et al.*, 1974) han sido considerados confiables para el diagnóstico del RR. Un nuevo método ha sido desarrollado recientemente (Benda, 1971) empleando el sorgo híbrido NB280S el cual muestra síntomas de marchitez.

Considerando la importancia del raquitismo del retoño en las principales regiones cañeras del mundo, se planteó una investigación con el objetivo de verificar su incidencia en los cañales de Costa Rica, así como para determinar si hay variabilidad local entre poblaciones del agente causal.

MATERIALES Y METODOS

Determinación de distribución e incidencia

Durante el período comprendido entre junio 1984 y agosto de 1985 se obtuvo un total de 260 muestras de tallos de caña de las siguientes localidades: Turrialba, Pérez Zeledón, Grecia, San Carlos, Cañas y Filadelfia, a razón de 3 a 5 cultivares por localidad y 10 muestras por cultivar. Las muestras fueron tomadas al azar y consistieron de los tres internudos inferiores.

Los esquejes de caña procedentes de cada zona se lavaron con cepillo, agua y jabón, se cortaron los entrenudos de aproximadamente 5 cm de longitud y se colocaron en tubos de centrifuga. Se centrifugó a 5000 G por 5 minutos. Del jugo vascular extraído se tomó una alícuota de 50 μ l, se colocó en un portaobjetos, se montó en microscopio a contraste de fases y se observó a inmersión a 1000X. Por cada muestra se observó un total de 10 campos.

Comparación fenotípica de cepas

Muestras de esquejes de las seis localidades mencionadas se lavaron con esponja, agua y jabón, se sumergieron en etanol al 70% y luego al 90%, se flamearon y se colocaron en tubos de centrifuga estériles. Se centrifugó por 5 minutos a 8000 G.

Al jugo vascular así extraído se le hizo diluciones consecutivas en solución amortiguadora de sales de fosfato (PBS) hasta 10^{-4} ; de cada una de ellos, se tomaron porciones de 1 ml y se esparcieron sobre el agar SC (Davis *et al.*, 1980). Los platos se incubaron a 28 C por 22 días.

Los aislamientos y la determinación de características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas se realizaron en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Microbiología, UCR, según métodos descritos anteriormente (Davis *et al.*, 1984; Fernández *et al.*, 1984). Como control se usó una cepa tipo de *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* proveniente de Estados Unidos de N. A.

Con el objeto de demostrar los postulados de Koch con las cepas aisladas localmente, se realizaron pruebas de patogenicidad en el sorgo híbrido NB280S y en el cultivar de caña de azúcar CP44-101, en los invernaderos del laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía, UCR, según método descrito por Davis *et al.* (1980).

Para las observaciones al microscopio electrónico se montaron las bacterias en rejillas de cobre, previamente fijadas en glutaraldehído, las que se sumergieron en ácido fosfotúngstico (Teakle *et al.*, 1979) y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión.

RESULTADOS

Distribución e incidencia

Se determinó que la enfermedad se encuentra distribuida en todas las zonas muestreadas (Cuadro 1); en la zona de Pérez Zeledón se observó la mayor incidencia del RR (66%) y en las zonas de Cañas y Filadelfia se observó la menor (3%).

El cultivar B4744 procedente de San Carlos fue el que presentó el mayor número de muestras positivas al RR; fue en este mismo cultivar en donde se observó el mayor porcentaje de incidencia del RR por cultivar en el país (77%), como se

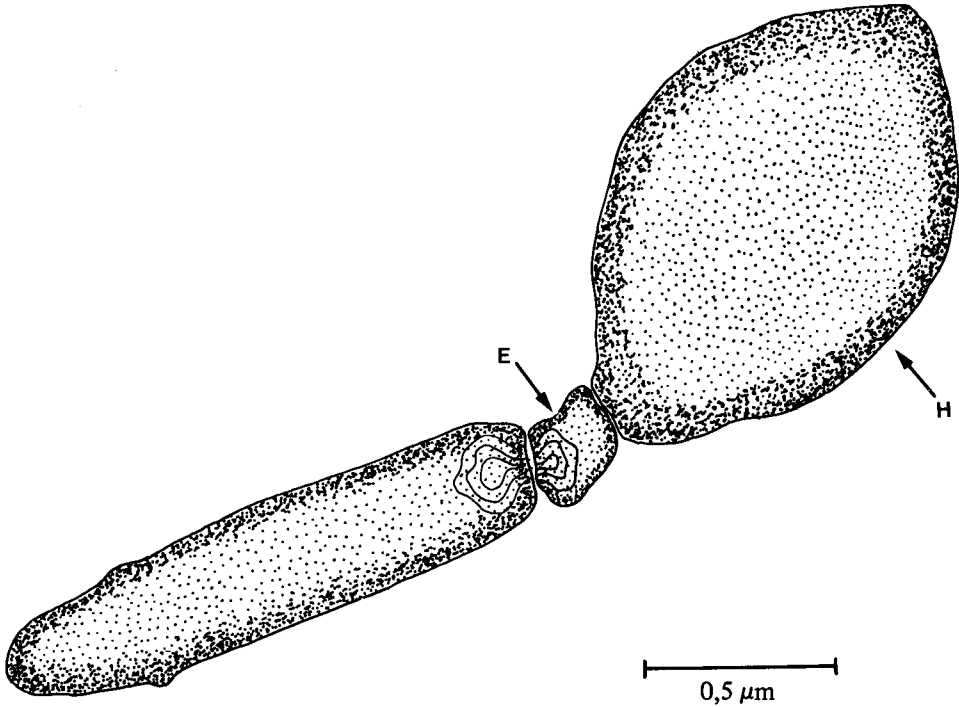


Fig. 2. Forma hinchada (H) y forma enana (E) de *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* como componentes de una cadena de estreptobacilos.

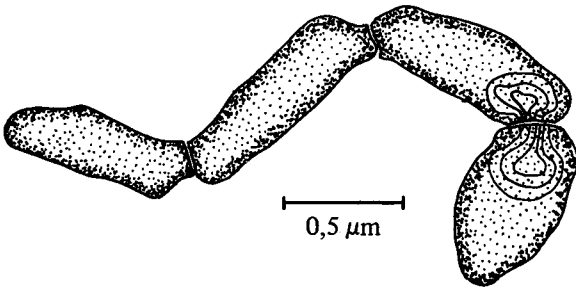


Fig. 1. *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* formando una cadena corta. Nótese el pleomorfismo.

muestra en el Cuadro 1. El porcentaje promedio general de incidencia en Costa Rica fue de 30% .

Comparación fenotípica de cepas

Se aisló una cepa de *Clavibacter xyli* subespecie *xyli* de cada una de las seis zonas muestreadas; el crecimiento bacteriano fue observado después de 15 días de incubación aerobia a 28 C.

Los resultados de algunas características bioquímicas y fisiológicas han sido agrupados en el Cuadro 2.

No se observó diferencia entre cepas locales en cuanto al ámbito de temperatura de crecimiento. Las bacterias crecen desde temperatura ambiente hasta los 31,5 C. El crecimiento óptimo de *C. xyli* ocurre en aerobiosis. La presencia de cantidades relativamente altas de CO₂ (10%) no favorece el crecimiento y por el contrario, lo retarda. No se observó crecimiento de *C. xyli* después de 21 días de incubación en jarra anaerobia Gas-Pack.

Los postulados de Koch fueron probados satisfactoriamente tanto sobre sorgo híbrido NB280S, en donde los síntomas consistieron en un marchitamiento de los brotes de los tallos inoculados, como sobre el cultivar de caña CP44-101, en donde los síntomas se presentaron de las 5 a las 7 semanas después de inoculados y consistieron en una descoloración púrpura en el ápice. En los controles no se observó síntomas.

Las bacterias del RR miden de 0,2 a 1 µm de diámetro y de 1 a 6 µm de largo. No son móviles y no presentan flagelos. Las células no se encapsulan y no forman esporas. La reacción a la coloración de Gram es positiva.

Las observaciones de la bacteria al microscopio electrónico de transmisión muestran que tiene

Cuadro. 1. Incidencia del RR por cultivar de caña en seis zonas cañeras de Costa Rica.

Localidad	Número de muestras positivas, de 10 observadas por cultivar														Proporción por Localidad	Incidencia (%)	
	a*	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n			
Juan Viñas	5	5	3			2	2									17/50	34
Pérez Zeledón	8	6	6	8	5											33/50	66
San Carlos	1			9	0		0							3		13/50	26
Grecia				6			2		3	1			0			12/50	24
Cañas								0			1	0				1/30	3
Filadelfia								1			0	0				1/30	3
Proporción por cultivar	14/30	11/20	9/20	23/20	5/20	2/10	4/30	1/20	3/10	1/10	1/20	0/20	0/10	3/10			
Incidencia (%) por cultivar	47	55	45	77	25	20	13	5	30	10	5	0	0	30			

* CULTIVARES: a Pindar; b H443098; c H328560; d B 4744; e H60267; f H564848; g B50377; h N: CO310; i Mex 58126; j POJ 2878; k Q 68; l Q 75; m H575174; n 60125.

Cuadro 2. Características bioquímicas y fisiológicas de seis aislamientos de *C. xyli* subsp. *xyli* de Costa Rica

Prueba	Cepas					
	JV	PZ	Fi	Gr	Ca	SC
Hidrólisis de:						
Gelatina	-	-	-	-	-	-
Esculina	-	-	-	-	-	-
Almidón	-	-	-	-	-	-
Caseína	-	-	-	-	-	-
Utilización de:						
Acetato	-	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	-	-
Malato	-	-	-	-	-	-
Halotolerancia:						
NaCl						
0%	+	+	+	+	+	+
1	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+
3	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
Oxidasa	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+
Rojo de metilo	-	-	-	-	-	-
Producción de H ₂ S	-	-	-	-	-	-

() = indica inconsistencia al repetir la prueba.

JV = Juan Viñas; PZ = Pérez Zeledón; Fi = Filadelfia; Gr = Grecia; Ca = Cañas; SC = San Carlos.

una pared celular lisa. Existe una marcada tendencia al pleomorfismo celular así como a permanecer unidos los bacilos formando cadenas cortas (Figura 1). Se observaron formas hinchadas de hasta 1 µm en diámetro y formas adelgazadas en uno de los polos (Figura 2).

DISCUSION

Empleando el método descrito, la enfermedad se encontró en todas las zonas muestreadas, como también se ha encontrado en todas las áreas cañeras en donde el RR ha sido buscado.

La alta incidencia del RR en el cultivar B4744 concuerda con las observaciones de los agricultores en el sentido de que este cultivar degenera rápidamente, aunque no se excluye la posibilidad de que exista una correlación entre la incidencia del RR y los años de introducción de dicho cultivar al país.

Con base en: a) la ausencia de diferencias en los análisis morfológicos, bioquímicos y fisiológicos realizados a las cepas aisladas localmente, b) en la ausencia de diferencias entre estas cepas y la cepa control tipo de *C. xyli* subsp. *xyli*, y c) en el hecho de que Davis *et al.* (1984) no encuentran diferencias fenotípicas entre 17 aislamientos de *C. xyli* subsp. *xyli* obtenidos de caña de varios países, incluyendo la cepa tipo, se puede especular que se trata de una subespecie con identidad fenotípica

Las observaciones ultraestructurales de los aislamientos locales de las bacterias del RR no muestran diferencias con respecto a las descritas en trabajos previos (Kao y Damann, 1980; Kamiuten y Wakimoto, 1976; Steindl, 1961).

RESUMEN

Con el fin de conocer la distribución e incidencia en Costa Rica del raquitismo del retoño de la caña de azúcar (RR), se obtuvo un total de 260 esquejes en seis zonas cañeras del país: Filadelfia, Pérez Zeledón, Cañas, Grecia, San Carlos y Juan Viñas. El jugo vascular de cada muestra fue extraído por centrifugación de los internodos y la presencia o ausencia de la bacteria causal se determinó empleando microscopía a contraste de fases. La enfermedad se encontró distribuida en todas las regiones muestreadas entre 3 y 66% y la incidencia por variedad fue de 0 a 77%. La incidencia más alta (77%) correspondió al clon de caña B4744 procedente de San Carlos.

De las mismas zonas cañeras se aislaron 6 cepas de la bacteria causal, *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* que fueron sometidas a pruebas morfológicas, bioquímicas y fisiológicas, usando el medio apropiado y una incubación de 22 días a 28 C. Para las pruebas de patogenicidad se empleó el clon de caña CP44-101 y el sorgo híbrido NB280S.

Las colonias de la bacteria del RR alcanzan un diámetro máximo de 0,1 a 0,3 mm tras 21 días de incubación. Al microscopio las bacterias se presentaron como bacilos gram-positivos de 0,2 x 5 µm de tamaño medio, no esporulados,

no encapsulados ni móviles y pleomórficos, frecuentemente a manera de mazas o más hinchadas aún. No se observó flagelos. Otras características incluyen reacciones de catalasa positivas y de oxidasa negativas.

No se encontró diferencias fenotípicas entre las cepas de Costa Rica y la cepa tipo de *C. xyli* subsp. *xyli*.

LITERATURA CITADA

- BENDA, G. T. 1971. Vinting and death in the ratoon stunting disease of sudangrass hybrid. Proc. Amer. Soc. Sugar Cane Technologists 1: 39-47.
- DAVIS, M. J.; DEAN, J. L. 1984. Comparison of diagnostic techniques for determining incidence of ratoon stunting disease of sugar cane in Florida. Plant Disease 60:896-899.
- DAVIS, M. J.; GILLASPIE, A. G. Jr.; HARRIS, R. W.; LAWSON, R. H. 1980. Ratoon stunting disease of sugar cane; isolation of the causal bacterium. Science 210:1365-1367.
- DAVIS, M. J.; GILLASPIE, A. G. Jr.; VIDAVER, A. J.; HARRIS, R. W. 1984. *Clavibacter*: A new genus containing some phytopathogenic bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugar cane and bermuda grass stunting disease. Int. J. Syst. Bact. 34: 107-117.
- EARLY, H. P. 1975. Ratoon stunting disease of sugarcane in Kenya. East African Agricultural and Forestry Journal 41(2): 106-109.
- FERNANDEZ, B.; BRUNKER, T.; SALGADO, E. 1984. Microbiología básica y aplicada: Manual de laboratorio 3ed. San José, Universidad de Costa Rica. 154 p.
- GILLASPIE, A. G. Jr.; DAVIS, R. E.; WORTY, J. F. 1973. Diagnosis of ratoon stunting disease based on the presence of a specific microorganism. Plant Disease Reporter 12: 897-990.
- GILLASPIE, A. G. Jr.; IRVINE, J. E.; STEERE, R. L. 1966. Ratoon stunting disease virus; assay technique and partial purification. Phytopathology 56: 1426-1427.
- KAO, J.; DAMANN, K. E. Jr. 1980. *In situ* localization and morphology of the bacterium associated with ratoon stunting disease of sugarcane. Can. J. Bot. 58:310-315.
- KAMIUTEN, H.; WAKIMOTO, S. 1976. Coryneiform bacteria found in the xylem of the ratoon stunting disease of sugarcane. Ann. Phytopathol. Soc. Japan 42: 500-503.

- KOIKE, H.; GILLASPIE, A. G. Jr.; BENDA, G. T. 1982. Cane yield response to ratoon stunting disease. *Int. Sugar J.* 84: 131-133.
- MATSUOKA, S. 1971. Elephant grass as an indicator plant for ratoon stunting virus of sugarcane. *FAO, Plant Prot. Bull.* 19:110-115.
- SCHEXNAYDER, C. A. 1960. The use of sugarcane: a "test plant" as a means of detecting the presence of the ratoon stunting disease in sugarcane. *Int. Soc. Sugar Cane Technologist Proc.* 10:1068-1072.
- SINGH, G. R. 1969. An indicator sugarcane variety for ratoon stunting disease. *Current Sci.* 38: 221-222.
- STEINDL, D. R. L. 1961. Ratoon stunting disease. *In* Sugarcane disease of the world. Ed. by J.P. Martin; E. V. Abbot and C.G. Hughes. Amsterdam, Elsevier Publishing Co. v. 1, 542 p.
- STEINDL, D. R. L.; TEAKLE, D. S. 1974. Recent developments in the identification of the ratoon stunting disease. *Proc. of the Queensland Soc. of Sugar Cane Technologist.* 41st. conf.. Townsville Old Queensland.
- TEAKLE, D. S.; KONTZE, D.; APLETON, J. M. 1979. A note on the diagnosis of the ratoon stunting disease by negative-stain electron microscopy of the associated bacterium. *J. Appl. Bact.* 46: 279-284.
- WEAVER, L.; TEAKLE, D. S.; HAYWARD, A. C. 1977. Ultrastructural studies on the bacterium associated with ratoon stunting disease of sugar cane. *Aust. J. Agric. Res.* 28: 843-852.