

ESCALDADURA FOLIAR DE LA CAÑA DE AZÚCAR EN CUBA: CARACTERIZACIÓN, DIVERSIDAD Y DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE SU AGENTE CAUSAL [*Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson].

DÍAZ, Maricela.¹ ; IGLESIA, Aleyka¹ ; ÁLVAREZ Elba¹ ; GIGLIOTI, E. A² ; ROS, P. B² ; LAGAZZI, G.² ; GAGLIARDI, P. R.³ ; CAMARGO, L. E. A.³ y PERALTA, Esther Lilia⁴.

¹CENSA, Apdo. 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba, CP 32700; ²UFSCar, Rod. SP330 Km 174, 13600-970, Aranas, Sao Paulo, Brasil; ³ ESALQ-USP, 13418-900, Piracicaba, Sao Paulo, Brasil; ⁴ IICF, Miramar, Cuba.

SÍNTESIS

La escaldadura foliar de la caña de azúcar, enfermedad bacteriana vascular causada por *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, tiene una amplia distribución mundial y es capaz de ocasionar pérdidas agrícolas de más del 90% en su fase aguda. En Cuba se detectaron focos de la enfermedad entre 1979 y 1982, año en que se consideró controlada y objeto de cuarentena nacional. A partir de 1994 se advirtió sobre la presencia de infecciones latentes en vitroplantas y plantaciones comerciales y se señaló el peligro del resurgimiento de la enfermedad, que finalmente tuvo lugar a inicios de 1998, afectando varias provincias cubanas. Este trabajo ha estado dirigido a determinar las características y diversidad de las poblaciones de *X. albilineans* circulantes en Cuba, identificar el origen del brote actual de la enfermedad y perfeccionar los métodos para su diagnóstico. Se emplearon para ello procedimientos tradicionales y de biología molecular.

Las características morfológicas y bioquímicas de los aislamientos estudiados fueron poco variables. Sin embargo, se evidenciaron notables diferencias serológicas y moleculares entre los procedentes de infecciones latentes y los circulantes en el brote actual de escaldadura, identificándose por primera vez en el país los serovares I y III y once grupos genómicos (GG-1 a GG-11), que están formados por los haplotipos combinados BOX, ERIC y REP y fueron denominados GG-1 a GG-11. Los grupos genómicos GG-2 y GG-4 agrupan el 62.9% de los aislamientos estudiados y presentan la mayor distribución nacional, encontrándose en cinco provincias. Los análisis realizados permitieron demostrar que el brote actual de escaldadura

en Cuba ha sido producido por nuevas variantes de la bacteria no detectadas con anterioridad en el país, determinándose que el 85.48% de los aislamientos obtenidos presentaron una homología superior al 91% con las cepas de referencia del grupo genómico B-01 (PFGE) de la Florida y Texas, identificados como los causantes del explosivo resurgimiento de la enfermedad en áreas de la región. El serovar I y el haplotipo B-01 son los predominantes en la actualidad.

Los parámetros de desempeño de la n-PCR para el diagnóstico de escaldadura son superiores al 98%, demostrándose la factibilidad del uso de aplicadores de algodón para la toma y conservación de las muestras a diferentes temperaturas, sin afectación de la eficacia. Mediante el método de diagnóstico validado se detectó la presencia de *X. albilineans* en 91 clones y variedades de caña de azúcar. Adicionalmente se demostró que el procedimiento desarrollado puede aplicarse para la detección simultánea de *X. albilineans* y *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* con una eficacia superior al 93%.

TABLA DE CONTENIDO

Pág.

I. INTRODUCCIÓN

II. MATERIALES Y MÉTODOS

III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. CONCLUSIONES

V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXOS

I. INTRODUCCION

El cultivo de la caña de azúcar es el más voluminoso de los existentes en la actualidad, con cosechas anuales que producen el 64% del azúcar que se consume mundialmente. En nuestro país, abarca más del 40% de las áreas cultivables y constituye la primera fuente de exportación. Los rendimientos del cultivo y la calidad de los programas de certificación de semilla y de mejoramiento genético, dependen en gran medida de la incidencia e importancia económica de las plagas que lo afectan, así como de la disponibilidad de métodos eficientes para su detección.

Dentro de las enfermedades denominadas mayores de la caña y que más influencia tienen en su calidad fitosanitaria, se encuentra la escaldadura foliar, causada por *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson. La escaldadura foliar se ha identificado en 65 áreas geográficas (Rott y Davis, 2000) y constituye una enfermedad potencialmente peligrosa por las pérdidas que ocasiona en la fase aguda, estimadas entre el 90-100% (Ricaud y Ryan, 1989).

En Cuba se detectó la presencia de 14 focos de la enfermedad distribuidos en 7 provincias en el período 1979-1982, año en que se consideró controlada y objeto de cuarentena nacional. A partir de 1994 se advirtió sobre la presencia de infecciones latentes en vitroplantas y plantaciones comerciales y se señaló el peligro del resurgimiento de la enfermedad (Peralta *et al.*, 1997), que finalmente tuvo lugar a inicios de 1998, afectando varias provincias cubanas.

Recientemente la incidencia de la enfermedad ha llamado poderosamente la atención debido a su incremento a niveles alarmantes en algunas regiones, incluyendo países del área del Caribe (Davis, *et al.*, 1997). La causa de los nuevos brotes de la enfermedad, se atribuye a nuevas variantes del patógeno surgidas, ya sea por mutación de las cepas establecidas o por introducción de cepas exóticas, han sido la causa de dichos brotes.

Aunque *X. albilineans* constituye una especie bien delimitada, con gran homogeneidad respecto a sus características fisiológicas y bioquímicas (Van Den Moyter y Swings, 1990), existe heterogeneidad entre las diferentes cepas del patógeno con respecto a los perfiles proteicos y serológicos (Ricaud y Ryan, 1989; Yang *et al.*, 1993; Rott *et al.*, 1986, 1994). Además han sido establecidos diez grupos genómicos (A-J), mediante electroforesis de campo pulsante (PFGE) (Clerc, 1997; Davis *et al.*, 1997). Así, el surgimiento de nuevos brotes de la enfermedad, impone la necesidad de profundizar en el conocimiento de la variabilidad de este patógeno y perfeccionar los métodos de diagnóstico con la finalidad de facilitar la detección de las variantes presentes en cada área geográfica.

Teniendo en cuenta que el resurgimiento de la enfermedad ha elevado la complejidad de la situación fitosanitaria del cultivo en el país y la ocurrencia de brotes recientes en áreas del Caribe y la Florida, causados por una nueva variante genómica del patógeno, nos propusimos la siguiente hipótesis de trabajo:

El brote actual de escaldadura foliar en Cuba, tiene un origen similar al de los ocurridos recientemente en otros países de la región, lo que puede demostrarse mediante análisis serológicos y moleculares, que permitirán además establecer un sistema novedoso de diagnóstico adecuadamente validado para la detección de las variantes que se identifiquen en el país.

Para demostrar esta hipótesis, se trazaron los siguientes objetivos de trabajo:

1. Caracterizar los aislamientos de *X. albilineans* circulantes en los focos de escaldadura existentes en el país y compararlos desde el punto de vista morfológico, bioquímico, serológico y molecular con los obtenidos previamente a partir de infecciones latentes de la enfermedad.
2. Determinar la diversidad serológica y genómica de las poblaciones cubanas de *X. albilineans* y las variantes de la bacteria presentes en el país.
3. Desarrollar y validar métodos moleculares para el diagnóstico de la enfermedad.
4. Aplicar los métodos de diagnóstico desarrollados para la detección de la enfermedad en variedades comerciales y clones del Banco de Germoplasma cubano.

II. MATERIALES Y METODOS

II.1 Descripción de síntomas y obtención de aislamientos

A partir de la aparición de los síntomas de la enfermedad en Febrero de 1998 en el Banco de Germoplasma de la EPICA de Jovellanos (Matanzas) se realizaron muestreos, en los cuales se seleccionaron al azar muestras representativas de diferentes variedades, con síntomas típicos o dudosos y asintomáticas. De cada variedad se tomaron muestras de dos plántones. Posteriormente con la colaboración del Departamento Fitosanitario del MINAZ, los fitosanitarios de cada provincia y Cuarentena Vegetal, se recibieron muestras de diferentes EPICAs y CAIs de las provincias de Pinar del Río, La Habana, Camagüey, Ciego de Ávila, Las Tunas y Holguín. Fueron analizadas muestras de 56 variedades procedentes de 16 localidades de estas 7 provincias del país.

Se realizaron aislamientos de macerados en solución salina estéril de hojas y brotes laterales, así como de jugos de tallos extraídos por centrifugación y maceración, que se sembraron en medio Agar Wilbrink suplementado con ciclohexamida y extracto de levadura (Rott *et al.*, 1988; Davis *et al.*, 1994). Las placas fueron incubadas a 28°C hasta los diez días y las colonias con características típicas de *X. albilineans* fueron seleccionadas; se les realizó la tinción de Gram y se comprobó su crecimiento negativo en medio Agar Nutriente. Después de dos pases sucesivos de una colonia y comprobada su pureza, los aislamientos fueron conservados de acuerdo a lo descrito por Moore *et al.*, 1988 y Rott *et al.*, 1996.

II.2 Identificación de los aislamientos de *X. albilineans* mediante PCR anidada (n-PCR)

La identificación de los aislamientos obtenidos de diferentes clones y variedades durante el brote actual de la enfermedad (Tabla 1), se realizó mediante la amplificación específica de fragmentos de ADN del complejo de genes albicidina por PCR anidada (n-PCR) (Davis *et al.*, 1997). Se incluyeron además, aislamientos realizados a partir de vitroplantas asintomáticas obtenidas en las biofábricas del país en el período 1994-1997 (L1-L3) (Martín *et al.*, 2000); 16 cepas de referencias procedentes de diferentes colecciones internacionales (R1-R16) y 7 aislamientos de otras especies bacterianas patógenas a caña de azúcar (S1-S7) (Tabla 2). La extracción de ADN se realizó de acuerdo con el método descrito por Ausubel *et al.*, (1992).

Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis a 80 V en solución 0.5X TBE (45 mM Tris, 45mM de ácido bórico y 1mM EDTA) en gel de agarosa 1.5% conteniendo bromuro de etidio (0.5 µg/ml de gel). La talla de los fragmentos obtenidos, 440 y 308 pb para ambas amplificaciones, fue comparada con el marcador de 100 pb (Promega).

II.3 Patogenicidad en maíz

A partir de estas pruebas iniciales de identidad, se evaluaron 20 aislamientos representativos de diferentes variedades y localidades del país, así como uno de la fase de latencia de la enfermedad (Martín *et al.*, 2000). En las Tablas 1 y 2 aparecen señalados los aislamientos utilizados. Se realizaron inoculaciones en plantas de maíz híbrido T-66 de 10 días de germinadas, utilizando suspensiones bacterianas a una concentración de 10^5 ufc /ml (Rivera *et al.*, 1985). El control fue inoculado con agua destilada estéril. La constatación de los síntomas fue realizada diariamente hasta los 30 días post-inoculación. Se realizó el reaislamiento del patógeno y se comprobó su identidad mediante n-PCR (Davis *et al.*, 1997).

II.4 Caracterización y diversidad de los aislamientos de *X. albilineans*

A partir de las pruebas iniciales de identidad y patogenicidad, se realizó la caracterización morfológica, bioquímica y fisiológica, empleando los mismos aislamientos cubanos descritos en el epígrafe anterior y las cepas de referencia R1, R2, R3, R4, R16. Para la caracterización serológica y molecular, se realizó el análisis y comparación de los aislamientos y cepas de referencias descritos en las Tablas 1 y 2. En la caracterización molecular se incluyeron además, ocho aislamientos brasileños (B1-B8), cedidos gentilmente por el Dr. Eder Giglioti de la UFSCar, Brasil.

II.4.1 Caracterización y diversidad morfológica

Se realizaron preparaciones para microscopía electrónica de transmisión por tinción negativa (Sigeo, 1990) con el objetivo de detectar el flagelo polar y determinar las dimensiones de las células bacterianas. Se midieron entre 65 y 189 células de los diferentes aislamientos a partir de las microfotografías electrónicas, se realizó un análisis de varianza con los datos obtenidos y se establecieron las diferencias significativas entre los distintos aislamientos (SAS, 1996). La descripción morfológica de las colonias se hizo sobre medio Agar Wilbrink.

II.4.2 Caracterización y diversidad bioquímica y fisiológica

Se determinó la presencia del pigmento xanthomonadina de acuerdo a la metodología descrita por Maringoni *et al.*, (1988) y se establecieron las propiedades bioquímicas más importantes para la determinación del género y especie de acuerdo a las metodologías descritas por Király *et al.*, (1974); Romeiro, (1976); Klement *et al.*, (1990) y Stead, (1990) y el Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey (Holt *et al.*, 1994).

II.4.3 Caracterización y diversidad serológica

Para determinar la reacción serológica de los aislamientos, se produjeron anticuerpos frente a las cepas de referencia, R1, R2, R3, R5, R7, R10 y R12, así como para los aislamientos cubanos L2 y C9 (Tablas 1 y 2). El procedimiento para la preparación del inmunógeno y el esquema de inmunización empleado fue el descrito por Calzadilla *et al.*, (1991).

La caracterización serológica se realizó mediante inmunodifusión doble en agar (IDD) según Ball, (1990) y UMELISA Indirecto (Peralta *et al.*, 1997), enfrentando cada aislamiento a los diferentes antisueros producidos. Los ensayos, se realizaron con suspensiones bacterianas ajustadas a 10^8 ufc/ml en solución fosfato salina (PBS). Para la IDD el antígeno fue tratado a 100 °C durante una hora y se utilizó 1% de agarosa en solución salina. Los resultados obtenidos por UMELISA fueron procesados estadísticamente, estableciéndose las diferencias significativas entre los distintos antígenos y antisueros. Se realizó un análisis jerárquico de conglomerados (clusters). Los dendogramas se construyeron por el método de Ward (Carpeta estadística del CENSA). Se realizó adicionalmente un análisis de componentes principales.

II.4.4 Caracterización y diversidad genotípica mediante rep-PCR

Se determinaron los patrones de amplificación de las secuencias repetitivas dispersas en el genoma con el iniciador BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Martin *et al.*, 1992; Koeuth *et al.*, 1995), y con los iniciadores ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') y ERIC2 (5'-AAGTAAGTACTGGGGTGACGG-3') (Kamoun y Kado, 1990; Hulton *et al.*, 1991) y REP1R-I (5'-IIIICGICGICATCIGGC-3') y REP2-I (5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3') (Higgins *et al.*, 1982; Gilson *et al.*, 1984). Los iniciadores fueron sintetizados por la Operon Technologies Inc, California, E.U.

Las condiciones de amplificación utilizadas fueron establecidas a partir de las descritas por Versalovic *et al.*, (1991 y 1994), de Bruijn, (1992), Louws *et al.*, (1994); López *et al.*, (1998) y Rademaker *et al.*, (1998).

Alícuotas de 6 μ l de los productos de amplificación fueron separados en gel de agarosa 1.5% en solución 0.5X TBE conteniendo bromuro de etidio (0.5 μ g/ml de gel), por 8 a 10 horas a 2.5 V/cm. La talla de los fragmentos obtenidos fue comparado con el marcador de 100 pb (Promega). El gel fue fotografiado en el fotodocumentador Image Master VDS (Pharmacia- Biotech) sobre luz ultravioleta.

Para confirmar la reproducibilidad de los perfiles obtenidos, se realizó la amplificación de cada aislamiento a partir de dos extracciones de ADN diferentes. Los perfiles únicos, considerados como representantes de un haplotipo, fueron analizados conjuntamente a través del análisis visual de las bandas. A partir de la presencia o ausencia de una banda en cada posición se confeccionó la matriz de datos binarios (1 para presencia y 0 para ausencia). La matriz de coeficientes de similitud entre los aislamientos estudiados fue calculada utilizando la métrica de Jaccard's y el dendograma por el método de agrupamiento UPGMA (Paquete estadístico SPSS para Windows, versión 1.3, 1993). Se realizó el análisis de los haplotipos obtenidos con cada iniciador individualmente, así como el análisis combinado de los mismos.

II.5 Desarrollo y validación del diagnóstico molecular de *X. albilineans* mediante PCR anidada (n-PCR)

II.5.1 Establecimiento del límite de detección con diferentes tipos de muestras

Para el montaje de la n-PCR se seleccionaron los iniciadores descritos por Davis *et al.*, (1997), diseñados a partir de la secuencia de un fragmento de ADN del complejo de genes albicidina (Rott *et al.*, 1996). Se estableció el límite de detección del ensayo a partir de suspensiones de ADN genómico (100 ng-10 fg); suspensiones bacterianas (10^{-1} a 10^{-10}) en agua estéril y jugo extraído de plantas sanas;

difusato foliar y jugo extraído por centrifugación (10^{-1} a 10^{-5}) de plantas con síntomas de la enfermedad (Pan *et al.*, 1997; Davis, *et al.*, 1994). En todos los casos se trabajó con los aislamientos C9 y B8 obtenidos de las variedades C120-78 y RB 955357. Se utilizó 1 μ l de cada una de las diluciones para la reacción de n-PCR. Se determinaron las unidades formadoras de colonias (ufc) detectadas en la reacción de amplificación (Wang *et al.*, 1999). Como controles negativos en cada ensayo fueron utilizados agua estéril, difusato foliar y jugo filtrado de las plantas sanas, así como suspensiones bacterianas y de ADN de *X. axonopodis* pv. *vasculorum* (S3).

Adicionalmente, alícuotas de 100 μ l de cada dilución preparada del jugo y el difusato foliar fueron tratadas por calor a 100°C durante 10 minutos en un baño de agua y mantenida a -20°C hasta su utilización (Wang *et al.*, 1999). Las condiciones de amplificación y de análisis de los productos del n-PCR fueron las descritas en el epígrafe II.2.

II.5.2. Evaluación de la utilización de aplicadores de algodón

Teniendo en cuenta que uno de los mayores problemas para la utilización de técnicas avanzadas de diagnóstico es la toma y conservación de las muestras, se evaluó la factibilidad de utilizar aplicadores de algodón con este objetivo.

II.5.2.1 Establecimiento de las condiciones óptimas de conservación y el límite de detección de la n-PCR utilizando los aplicadores de algodón

Se utilizaron aplicadores de algodón comerciales que fueron embebidos en 50 μ l de las diferentes muestras y diluciones anteriores, dejándolos secar durante una hora y conservándolos con posterioridad a temperatura ambiente, 4, 28 y -20°C. Se prepararon tres réplicas de cada muestra a las diferentes temperaturas y tiempos de conservación, evaluándose a los 15, 30 y 60 días de conservados. En todos los casos se utilizaron como controles muestras frescas de la suspensión bacteriana y jugos de plantas sanas y enfermas.

Se determinó el porcentaje de eficacia de la detección a los diferentes temperaturas y tiempos de conservación, de acuerdo a lo establecido por Peralta y Villoch (1999).

II.5.2.2 Evaluación de diferentes variantes para la toma de la muestra

Fueron colectadas plantas infectadas y sanas de diferentes variedades, cuyos tallos fueron lavados y separados los entrenudos. A partir de estos se obtuvieron 60 secciones internas del tallo, que fueron divididas en dos partes, una de las cuales fue utilizada para extraer el jugo con auxilio de un alicate y la otra para obtener el jugo por centrifugación. De cada una de las muestras fueron plaqueados 100 μ l en Agar Wilbrink para el aislamiento de la bacteria y alícuotas de 50 μ l se embebieron en los aplicadores de algodón, que fueron conservados a temperatura ambiente y evaluados a los 30 y 60 días. Se utilizaron como controles positivos ADN y muestras frescas de la suspensión bacteriana del aislamiento C9, así como jugo de tallo infectado extraído con alicate y por centrifugación. Como control negativo se utilizó el jugo de tallo de la planta sanas, así como ADN y/o suspensión bacteriana de *X. axonopodis* pv. *vasculorum*. En todos los casos las muestras fueron preparadas de acuerdo a los procedimientos descritos anteriormente (epígrafe II.5.1).

La comparación de las dos variantes de obtención de muestras se realizó sobre la base de los parámetros de desempeño del ensayo en cada caso. Los indicadores de validación estimados fueron los siguientes (Peralta y Villoch, 1999).

II.5.2.3 Evaluación de los aplicadores de algodón para el diagnóstico múltiple de escaldadura foliar y el raquitismo de los retoños

Teniendo en cuenta que la escaldadura foliar y el raquitismo de los retoños constituyen las dos enfermedades bacterianas más importantes de la caña de azúcar y la utilidad de abaratar los costos del diagnóstico mediante un ensayo capaz de detectarlas simultáneamente, se evaluó la efectividad de la detección de la n-PCR múltiple, utilizando los aplicadores de algodón para la toma y conservación de las muestras.

A partir de variedades con síntomas de ambas variedades, se prepararon diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-4}) en agua y por la mezcla en distintas proporciones de ambos jugos. Alícuotas de 50 μ l de cada dilución y de jugo sin diluir fueron absorbidos en los aplicadores de algodón y se conservaron a temperatura ambiente y a -20°C . Se realizaron tres réplicas de cada dilución para ambas temperaturas, evaluándose 90 aplicadores (muestras) a los 30 y 60 días.

La amplificación se realizó de acuerdo a lo descrito en el epígrafe II.2, con la adición de los iniciadores específicos para *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Astua-Monge *et al.*, 1996). Se determinaron los parámetros de desempeño del ensayo para la detección de ambas enfermedades, de acuerdo a lo descrito en el epígrafe anterior.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1 Descripción de síntomas y obtención de aislamientos

En los muestreos e inspecciones realizadas a partir de 1994, no se observaron síntomas típicos de esta enfermedad, detectándose solamente infecciones latentes en variedades como la Ja60-5, RB 72454 y C 323-68 y esporádicamente la presencia de rayas blancas finas ("pencil lines"), fundamentalmente en clones del Banco de Germoplasma. Los síntomas típicos de la fase crónica de la enfermedad (Ricaud y Ryan, 1989; Rott *et al.*, 1995) fueron observados a partir de febrero de 1998, caracterizándose por la presencia de rayas blancas o amarillentas paralelas a las nervaduras, de ancho variable, que se extendían hacia el borde de las hojas, provocando marchitamiento y necrosis foliar parcial o total. Adicionalmente se observó un notable desarrollo de brotes laterales desde la base de los tallos y un enrojecimiento en los vasos a nivel de los nudos e inclusive de los entrenudos. En algunas de las variedades afectadas, como la L55-5, los síntomas fueron severos, llegando a ocasionar la muerte de los tallos (Fig. 1).

Los síntomas más severos y generalizados del brote actual de escaldadura se presentaron en el Banco de Germoplasma de la EPICA de Jovellanos, donde fue encontrado el foco inicial de la enfermedad y en la provincia de Camagüey. Con posterioridad se han observado incrementos discretos de focos en áreas de otras provincias como Ciego de Ávila, La Habana y Pinar del Río.

La sintomatología que se ha presentado a partir de 1998 ha sido más severa que la informada por Rivera *et al.*, (1985) durante los años 1979-1982. A partir de los tallos, hojas y brotes de las

diferentes variedades analizadas se obtuvieron 62 aislamientos bacterianos, cuya descripción aparece en la **Tabla 1**.

III.2 Identificación de los aislamientos de *X. albilineans* mediante PCR anidada (n-PCR)

Los aislamientos cubanos obtenidos, fueron identificados como pertenecientes a la especie *X. albilineans*, de acuerdo a la amplificación específica obtenida de fragmentos de ADN del complejo de genes que codifican la síntesis de la albicidina (**Fig. 2**).

El valor de este ensayo para la identificación del agente causal de la escaldadura foliar ha sido señalado por Rott *et al.*, (1996), quienes demostraron que el complejo de genes involucrados en su síntesis es altamente específico para la especie, única conocida hasta el momento como productora de la mencionada toxina.

Nuestros resultados confirman la especificidad de esta prueba y demuestran su utilidad como criterio de identificación molecular, de acuerdo a la tendencia actual debido a las limitaciones crecientes de las pruebas fenotípicas para la identificación de las especies bacterianas fitopatógenas (Henson y French, 1993; Vauterin *et al.*, 1995; Takatsu, 2000).

III.3 Patogenicidad en maíz

Las pruebas de patogenicidad realizadas en maíz permitieron la reproducción de los síntomas característicos de la enfermedad. En las evaluaciones visuales no se observaron diferencias en la respuesta provocada por cada aislamiento con respecto a las características de los síntomas y la agresividad con que se desarrollaron los mismos. Los primeros síntomas de líneas blancas finas se presentaron a los 5-7 días después de la inoculación, hasta llegar a tener los síntomas típicos de la enfermedad. En todos los casos fue posible realizar el reaislamiento del patógeno, cuya identidad fue confirmada mediante n-PCR (Davis *et al.*, 1997).

Los síntomas obtenidos, constituyen una comprobación de la patogenicidad de los aislamientos cubanos del brote actual. A pesar de no haberse detectado diferencias marcadas entre ellos, es necesario continuar profundizando en este aspecto, particularmente en el análisis de su interacción con diferentes variedades de caña de azúcar.

Hasta el momento no ha podido establecerse sin equívoco la existencia de razas patogénicas en esta especie, pero sí de variantes serológicas y genómicas bien definidas. Es por ello que la tendencia actual en los grupos que estudian esta enfermedad es delimitar, como primer paso, las variantes fenotípicas y genotípicas existentes en la población del patógeno y con posterioridad evaluar la variación intraespecífica desde el punto de vista patogénico de los aislamientos representativos de los grupos o variantes establecidas (Clerc, 1997; Davis *et al.*, 1997; Rott y Davis, 2000). Atendiendo a lo anterior, los resultados de este trabajo constituyen la base sobre la que podrían estructurarse las investigaciones futuras en cuanto a la escaldadura foliar en el país.

III.4 Caracterización y diversidad de los aislamientos de *X. albilineans*

III.4.1 Caracterización y diversidad morfológica

Las características morfológicas de los aislamientos realizados se corresponden a las descritas para esta especie (Ricaud y Ryan, 1989; Stanley y Williams, 1994). Las células son móviles con un único flagelo polar, bacilares y Gram negativas. Las dimensiones de las células de los diferentes aislamientos y cepas de referencia, fue de 0.39-0.83 x 1.28-1.84 μ , parámetros que coinciden con los descritos para esta especie (Holt, 1994).

Se encontró variabilidad tanto entre las cepas de referencia como entre los aislamientos cubanos, sin relación directa con su procedencia, propiedades bioquímicas, serológicas o su manifestación patogénica en el país. Los aislamientos procedentes de las variedades L55-5 (C1- C4) y C120-78 (C7- C10), se encontraron variaciones en la longitud media de las células y la morfología de las colonias en cultivo entre los aislamientos hechos a partir de hojas, brotes y tallos de una misma planta, e inclusive entre los aislamientos obtenidos de un mismo tallo.

En medio Agar Wilbrink, las colonias se observaron a los 4-7 días después de la siembra, pequeñas, circulares, lisas, convexas, de bordes enteros, brillantes, translúcidas y de color amarillo pálido. No crecieron en medio Agar Nutriente, ni produjeron mucosidad al crecer sobre cuñas inclinadas de medio YDC. La información sobre variabilidad morfológica de esta especie y su correlación con las variaciones serológicas, moleculares y patogénicas de los aislamientos es muy limitada en el ámbito internacional.

III.4.1.2 Caracterización y diversidad bioquímica y fisiológica

Las pruebas bioquímicas realizadas confirmaron la presencia de la especie *X. albilineans*, presentando coincidencia en general para los aislamientos obtenidos. Se observaron espectros de absorción típicos del pigmento xanthomonadina,, los cuales presentaron un pico máximo de absorbancia a 443, 7 nm, lo que se corresponde con lo descrito para el género *Xanthomonas* (Holt *et al.*, 1994). Los resultados de la caracterización bioquímica se presentan en la **Tabla 3**.

Se encontró una total coincidencia entre las propiedades bioquímicas en la población bacteriana estudiada, con la excepción producción de ácido a partir de fructosa y la utilización de la gelatina, destacándose en este sentido las cepas C4 y C10, que también mostraron diferencias morfológicas en sus colonias y células de mayor longitud. Estos resultados confirman lo señalado por otros autores (Yang *et al.*, 1993; Vauterin *et al.*, 1995), sobre la homogeneidad de las propiedades bioquímicas y fisiológicas de esta especie.

III.4.3 Caracterización y diversidad serológica

Los aislamientos realizados durante la fase latente de la enfermedad se diferencian de la mayoría de los circulantes actualmente. El análisis estadístico de los resultados obtenidos con diferentes antisueros y cepas cubanas y de referencia mediante la técnica UMELISA Indirecto, estableció la formación de tres grupos serológicamente bien diferenciados (**Fig. 3**).

Las notables diferencias antigénicas de los aislamientos de la fase latente con respecto a los obtenidos a partir de los focos recientes de la enfermedad fueron claramente establecidas en los ensayos de inmunodifusión, mostrando patrones de precipitación de total identidad con las cepas de referencia R3 y R4. Los antisueros del aislado C9 y las cepas del serovar I, reaccionaron positivamente al enfrentarse

a sus antígenos homólogos y las cepas R1 y R2, pero no con los aislados latentes ni las cepas de referencia francesas.

Resultados similares fueron obtenidos por UMELISA Indirecto (**Fig. 4**). Las evaluaciones realizadas han demostrado que la mayoría de los aislados bacterianos circulantes en los focos recientes de la enfermedad pertenecen al serovar I, no identificado con anterioridad en nuestro país. No obstante, se detectaron variaciones antigénicas entre los aislamientos del propio serovar.

Adicionalmente, los aislados de la fase latente fueron identificados como serovar III. Los restantes aislamientos que mostraron diferencias antigénicas con los dos grupos anteriores, han presentado una reacción semejante con los antisueros de las cepas R7, R10 y R12, por lo que no es posible identificarlos hasta el momento dentro de alguno de los serovares conocidos. Es por ello que se hace necesario ampliar el estudio con nuevos antisueros producidos frente a un mayor número de cepas pertenecientes a estos serovares para lograr su identificación definitiva.

Los resultados de este trabajo establecen por primera vez la presencia en Cuba de los serovares I y III y demuestran la diversidad antigénica de la población cubana de *X. albilineans*. Coincidentemente, la presencia de diferentes serovares ha sido registrada también en Guadalupe, Martinica y las Islas Saint Kitts (Daugrois, 1993; Rott *et al.*, 1994).

De los tres serovares identificados, el I (Mascarena), es el más representado en la mayoría de los aislamientos circulantes en el mundo actualmente, habiéndose demostrado la variabilidad dentro del propio serovar (Autrey *et al.*, 1993; Rott *et al.*, 1994; Alvarez *et al.*, 1996). En nuestro trabajo se demuestra que éste constituye el serovar predominante entre los aislamientos del brote actual de escaldadura, lo que lo vincula directamente al resurgimiento de la enfermedad en el país.

Los resultados obtenidos en este trabajo determinan la necesidad de introducir cambios en el sistema nacional de diagnóstico de la escaldadura foliar, con vistas a garantizar la adecuada detección de las variantes serológicas identificadas. Tales modificaciones incluyen la utilización de antisueros específicos para los serovares I y III. De acuerdo a las evaluaciones realizadas, los antisueros C9 y L2 son capaces de detectar la gama de aislamientos circulantes en la actualidad en el país y funcionan adecuadamente en el sistema UMELISA, establecido para la evaluación de los donantes y líneas del programa nacional de micropropagación de la caña de azúcar, y de los materiales sometidos a cuarentena. Estas modificaciones han sido convenientemente analizadas con los órganos científicos y productivos del MINAZ, habiéndose comenzado ya su implementación.

III.3.2 Caracterización y diversidad genotípica mediante rep-PCR

En este trabajo, el patrón electroforético generado por la amplificación de las secuencias conservadas y repetitivas en el ADN genómico de *X. albilineans* resultó en múltiples bandas, con variación en el tamaño de aproximadamente 260 a 1700 pb con el iniciador BOX, 270 a 1800 pb con ERIC y 200 a 1200 pb para REP. Con los iniciadores REP fue posible la amplificación de un mayor número de fragmentos por aislamiento. La comparación de los patrones de amplificación, reveló la presencia de 12 haplotipos con los iniciadores ERIC (E1-E12), 19 con BOX (B1-B19) y 22 con REP (R1-R2), de los cuales B1-B7, E1-E5 y R1-R6 representan los aislamientos cubanos (**Tabla 4**).

Es de señalar que los iniciadores BOX y ERIC, agruparon en los haplotipos B2 y E2 al 75.8% y 62.9% de los aislamientos obtenidos en el brote actual y las cepas de referencia R7 y R8, representativas del haplotipo B-01 (PFGE) procedentes de Texas y la Florida. Por otra parte, en los haplotipos B1 y E1 están representados los aislamientos de la fase latente de la enfermedad y las cepas de referencia R3, R4 y R16 de Francia. Sin embargo el polimorfismo revelado por los iniciadores REP los agrupó en haplotipos diferentes, aunque con una homología superior al 90%. **Las Figuras 5** muestran patrones de amplificación representativos de los diferentes haplotipos obtenidos con los iniciadores BOX y ERIC respectivamente. Las otras especies patógenas a caña de azúcar, mostraron patrones únicos y distintivos.

El análisis de los haplotipos combinados resultó en la formación de 28 grupos genómicos (GG-1 a GG-28) entre los aislamientos de *X. albilineans* estudiados, estando la población cubana representada por once de los mismos (GG-1 a GG-11), diez de ellos correspondientes a los del brote actual (**Tabla 4**).

El 85.48% de estos aislamientos, representados en 7 de los grupos genómicos establecidos, presentaron una homología superior al 91% con las cepas de referencia de la Florida (R8) y la de Texas (R7), ambas representantes del haplotipo B-01 (PFGE) y responsables del explosivo resurgimiento de la escaldadura en esa región. El grupo GG-1 (cepas "latentes"), mostró una homología de 97% con el GG-17 que representa las de referencia procedente de Francia, los cuales a su vez presentaron la mayor homología (88%) con el haplotipo G-01. Por otra parte los grupos GG-3 y GG-6 se agruparon con el haplotipo B-06, con un 88 y 84% de homología respectivamente, mientras que el GG-10 presentó un 85% de similitud con el haplotipo E-01, ambos procedentes de Guadalupe (**Fig. 6**).

Los grupos más numerosos, heterogéneos y representados en las diferentes localidades fueron GG-2 y GG-4, presentes en cinco provincias, que agrupan el 62,9% de los aislamientos estudiados. Por el contrario los grupos GG-3, GG-5, GG-8, GG-9, GG-10 y GG-11 están representados en una sola provincia. Aunque se obtuvieron variantes genómicas entre los aislamientos del brote actual, se evidencia la predominancia de un mismo patrón, fundamentalmente entre los de la provincia de Matanzas, lugar donde surgió el primer brote de la enfermedad y en el que el 74.35% de los aislamientos está representado por los haplotipos B2 y E2, y el 84.6% por la suma de los haplotipos mayoritarios R2 y R4, con independencia de la variedad o clon del que se obtuvo el aislamiento. El patrón observado en estos aislamientos también está presente en los de otras provincias.

Estos resultados indican que los grupos GG-2 y GG-4 han sido los responsables del resurgimiento de la enfermedad en el país. El hecho de encontrarlos representados en otras provincias, sugiere que se han diseminado rápidamente en nuestras condiciones a partir del foco inicial.

La prevalencia de estos grupos dentro de la población cubana de *X. albilineans*, su alto nivel de homología con el haplotipo B-01 y la identificación de gran parte de los aislamientos que lo forman como serovar I, sugiere que el brote actual de escaldadura foliar en Cuba tiene un origen similar a los ocurridos recientemente en la Florida, Guadalupe, Louisiana y Texas.

La mayor variabilidad genética en las diferentes provincias pudo apreciarse en Matanzas y la Habana, ambas con 6 grupos. Estos grupos pudieran estar vinculados a variantes presentes en el país y no detectadas con anterioridad o a múltiples introducciones del patógeno.

De igual forma se estableció la presencia de diferentes grupos genómicos en aislamientos de la misma variedad. Se destaca en este sentido que sólo en el caso de la C 88-382, aislamientos de diferentes localidades coincidieron genéticamente. Las mayores variaciones se encontraron en C120-78 y C323-68, esta última incluyendo la cepa L3 de la fase latente. Aunque es necesario profundizar en este aspecto, llama la atención la presencia de los grupos genómicos 2 y 3 en las variedades L55-5 y C120-78, que presentaron los síntomas más severos de la enfermedad en el foco inicial y también aislamientos con diferencias morfológicas y bioquímicas, aspectos que deben tenerse en cuenta para los futuros estudios de patogenicidad.

III.5 Desarrollo y validación del diagnóstico molecular de *X. albilineans* mediante PCR anidada (n-PCR)

III.5.1 Establecimiento del límite de detección con diferentes tipos de muestras

La utilización de los iniciadores seleccionados, permitió la amplificación de los dos fragmentos específicos a *X. albilineans* (400 y 308 pb) a partir de las diferentes muestras analizadas. El límite de detección determinado a partir del ADN fue de 0.1pg, mientras en las suspensiones bacterianas puras fue de 1-2 ufc/reacción (2×10^3 ufc/ml). A partir de los difusatos foliares y jugos de tallos se obtuvo amplificación hasta la dilución 10^{-4} , lo que representó concentraciones de 2-4 ufc/reacción (4×10^3 ufc/ml). No se encontró amplificación con los controles negativos utilizados.

A partir del difusato foliar y el jugo de caña, los mejores resultados fueron obtenidos con las muestras diluidas y tratadas con calor, tratamiento que probablemente destruye los inhibidores de la PCR (Prosen *et al.*, 1993)

Los resultados obtenidos, superan el límite de detección descrito por otros autores que utilizan la PCR clásica para el diagnóstico de esta especie, el cual ha sido de 5-10 ufc/reacción y 0.3pg de ADN (Honeycutt *et al.*, 1995; Pan *et al.*, 1997, 1998). La n-PCR evaluada en este trabajo, además de altamente específica para *X. albilineans*, resultó más sensible para el diagnóstico del patógeno que la BIO-PCR descrito anteriormente (Wang *et al.*, 1999), ventaja importante para el análisis de donantes de los procesos de micropropagación y la evaluación de variedades de interés sometidas a cuarentena post-entrada.

III.5.2 Evaluación de la utilización de aplicadores de algodón.

III.5.2.1 Establecimiento de las condiciones óptimas de conservación y el límite de detección de la n-PCR utilizando los aplicadores de algodón

En la **Fig. 7** se observan los productos de PCR (440 y 308 pb) obtenidos al analizar cada una de las muestras conservadas durante 60 días en los aplicadores de algodón a las diferentes temperaturas. Todas las muestras conservadas hasta los dos meses a las temperaturas evaluadas, resultaron positivas, para un 100% de eficacia. Se considera en este caso como definitivo el producto interno de la segunda amplificación, aspecto en el cual radican las ventajas de la n-PCR con relación al PCR clásico (Schadd *et al.*, (1995).

Estos resultados establecen la factibilidad del uso de los aplicadores de algodón como forma de toma y conservación de los jugos de tallos para su análisis mediante n-PCR, sin afectar el diagnóstico de la enfermedad. El límite de detección obtenido en estos ensayos fue similar al señalado anteriormente

para la n-PCR a partir de la suspensión bacteriana y de las diluciones del jugo de plantas con síntomas típicos de la enfermedad.

Los parámetros de desempeño determinados sobre la base de los resultados experimentales, muestran la potencialidad del uso de los aplicadores de algodón como una solución a las limitaciones de la toma, transporte y conservación de las muestras para el diagnóstico masivo de la enfermedad con grandes perspectivas de aplicación en los programas de mejoramiento genético y de producción de semilla certificada.

Este método ha sido extensamente utilizado en medicina humana y veterinaria (Ushijima *et al*, 1994; Krepel *et al*, 1995; Marquard *et al*, 1995; Stone *et al*, 1995; Sykes *et al*, 1998; Vitale *et al*, 1998; Moss y Haas, 1999), pero no se refiere su uso para el diagnóstico fitosanitario, por lo que los resultados expuestos en este trabajo constituyen el primer informe sobre su utilización para el diagnóstico de fitopatógenos.

III.5.2.2 Evaluación de diferentes variantes para la toma de la muestra

La extracción de la muestra por centrifugación permitió obtener mejores resultados, con 95% de sensibilidad, 100% de especificidad y 97,5% de eficacia. La extracción por alicate disminuye la sensibilidad del ensayo hasta un 86,66%.

Wang *et al* (1999) señalaron que los resultados de la n-PCR eran comparables a los del aislamiento *in vitro*. Nuestros resultados demuestran que ambas técnicas son igualmente eficaces para el diagnóstico de *X. albilineans*, con indicadores de validación superiores al 98% (100% de especificidad, 98,3% de sensibilidad y 99,16% de eficacia). Aunque estos disminuyen ligeramente al introducir la utilización de los aplicadores para la toma de la muestra, los parámetros de desempeño estimados demuestran que puede ser empleada para el diagnóstico con una elevada eficacia (100% de especificidad, 95% de sensibilidad y 9,5% de eficacia, **Tabla 5**).

III.5.2.3 Evaluación de los aplicadores de algodón para el diagnóstico múltiple de escaldadura foliar y raquitismo de los retoños

Se obtuvo la amplificación de los dos fragmentos que identifican a *X. albilineans* y el de 229 pb específico para y *L. xyli* subsp. *xyli*, tanto en muestras infectadas por uno de los patógenos como en aquellas en que se mezclaron los jugos infectados de ambas (**Fig. 8**).

Al emplear aplicadores conservados a -20°C, los parámetros de desempeño del ensayo son superiores al 95%, con un 97,78% de eficacia para la detección de estas especies bacterianas. La conservación a temperatura ambiente de los aplicadores afecta particularmente la sensibilidad de la detección de *L. xyli* subsp. *xyli*.

Aunque la validación de este procedimiento de detección simultánea es susceptible de ser mejorado con la evaluación de un mayor número de muestras, los resultados preliminares obtenidos en este trabajo, demuestran que es posible utilizarlo para detectar la presencia de ambos patógenos en muestras de tallos infectados conservadas en los aplicadores de algodón durante dos meses a -20°C con una elevada eficacia.

Es de señalar el interés práctico de este resultado que contribuye a reducir el tiempo y el costo del diagnóstico de las dos enfermedades bacterianas más importantes del cultivo en la actualidad.

IV. CONCLUSIONES

- Se demostró que el brote actual de escaldadura en Cuba ha sido producido por nuevas variantes de la bacteria no detectadas con anterioridad en el país, determinándose que el 85.48% de los aislamientos obtenidos presentaron una homología superior al 91% con las cepas de referencia del grupo genómico B-01 (PFGE) de la Florida y Texas, identificados como los causantes del explosivo resurgimiento de la enfermedad en áreas de la región.
- Se demostró que los aislamientos cubanos procedentes de infecciones latentes difieren serológica y molecularmente de los involucrados en el resurgimiento de la enfermedad en 1998.
- Se determinaron variaciones entre los aislamientos cubanos con respecto a la producción de ácido a partir de fructosa, la utilización de la gelatina, la morfología de las colonias y la longitud de las células bacterianas, no encontrándose una correspondencia directa entre éstas y las características serológicas y moleculares de los aislamientos.
- Se estableció la presencia en el país de los serovares I y III de *Xanthomonas albilineans*.
- Los iniciadores BOX y ERIC, agruparon en los haplotipos B2 y E2 al 75.8% y 62.9% de los aislamientos obtenidos en el brote actual y las cepas de referencia R7 y R8, representativas del haplotipo B-01 (PFGE) procedentes de Texas y la Florida. Por otra parte.
- En los haplotipos B1 y E1 están representados los aislamientos de la fase latente de la enfermedad y las cepas de referencia R3, R4 y R16 de Francia
- Se identificaron once grupos genómicos entre los aislamientos cubanos de *X. albilineans* (GG1-GG11) que están formados por los haplotipos combinados BOX, ERIC y REP
- Los grupos genómicos GG2 y GG4 agruparon el 62.9% de los aislamientos estudiados y presentan la mayor distribución nacional, encontrándose en cinco provincias.
- En las variedades L55-5, C120-78, C323-68, C1051-73, Ja60-5, Ja64-19 y RB72454 se encontró la presencia de más de un grupo genómico de *X. albilineans*.
- Se demostró que el procedimiento de PCR anidada validado es igualmente eficaz que el aislamiento *in vitro* del patógeno y permite la detección de las diferentes variantes de *X. albilineans* presentes en el país con parámetros de desempeño superiores al 98%.
- Se registra por primera vez el uso de aplicadores de algodón para la toma y conservación de de muestras, demostrándose su utilidad para el diagnóstico de la escaldadura foliar con una elevada eficacia.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akiba, F.(1978). Isolamento, inoculação e sobrevivência de *Xanthomonas albilineans* e avaliação da resistência à escaldura das folhas em cana-de-açúcar. ESALQ/USP. Piracicaba.95p. (Dissertação do Mestrado).
- Alvarez, A.M., Schenck, S., and Benedict, A.A.(1996).Differentiation of *Xanthomonas albilineans* strains with monoclonal antibody reaction patterns and DNA fingerprints. *Plant Pathol.*45:358-366.
- Astua-Monge, G.(1995). Detection of *Clavibacter xyli* subsp.*xyli*, the causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane, based on amplification of DNA in the ribosomal DNA spacer. Thesis presented to the requirements for the degree of Master of Science, University of Florida, 58 págs.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K.(1992). *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol.I, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
- Autrey, L.J.C.; Sauntally, S.; Dookun,A., and Médan, H.(1995).Studies on variation in the leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.* 21:485-497.
- Caffer, M.M., Giglioti, E.A. and Masuda, Y.(1999).Comparação de meios de cultura para detecção e quantificação de *Xanthomonas albilineans* e *Xanthomonas* Sp. em cana de açúcar. *Fitopatologia Brasileira*, 24 (Suplemento): 247, Agosto, 1999.
- Chen, C. T., Lin, C. P., and Liang, Y.G.(1993). Leaf scald of sugarcane in Taiwan. *Taiwan sugar*, 40:8-16.
- Clark, C.A., Chen, C., Ward-Rainey, N, and Pettis, G.S. (1998). Diversity within *Streptomyces ipomoeae* based on inhibitory interactions, rep-PCR, and plasmid profiles. *Phytopathol.*, 88:1179-1186.
- Clerc, F.(1997). Diversité génétique des *Xanthomonas* pathogènes de la canne á sucre. *Maîtrise em Bioingénieries*. Titre d` Ingénieur- Maître.CIRAD. Montpellier.
- Comstock, J.C., and Irey, M.(1992). Detection of the sugarcane leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*, using tissue blot immunoassay, ELISA and isolation techniques. *Plant Dis.* 76:1033-1035.
- Comstock, J.C., and Shine, J.M.(1992). Outbreak of leaf scald of sugarcane, caused by *Xanthomonas albilineans*, in Florida. *Plant Dis.* 76:426.
- Comstock, J.C., Wang, Z.K., Hatziloukas, W., and Schaad, N.W. (1997). Comparison of isolation, serological and PCR techniques to detect the leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*. ISSCT Pathology and Molecular Biology Workshop, Abstracts, South Africa, May, 1997.
- Croft, B.J., Greet, A.D., Leaman, T.E. and Teakle, D.S.(1994). Evaporative- binding enzyme linked immunoassay for diagnosis and varietal resistance screening of ratoon stunting disease in sugarcane. 4th ISSCT Pathology Workshop, Brisbane, Australia.
- Davis, M.J., Rott, P., and Astua-Monge, G.(1998). Nested, Multiplex PCR for detection of both *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* and *Xanthomonas albilineans* in sugarcane. Abstracts 7th International Congress of Plant Pathology. Edinburgh, Scotland.No.3.3.4.
- Davis, M.J., Rott, P., Baudin, P., and Dean, J.L. (1994). Evaluation of selective media and immunoassays for detection of *Xanthomonas albilineans*, causal agent of sugarcane leaf scald disease. *Plant Dis.* 78:78-82.
- Davis, M.J., Rott, P., Warmuth, C.J., Chatenet, M., and Baudin, P. (1997). Intraspecific genomic variation within *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. *Phytopathol.* 87: 316-324.
- de BRUIJN, F.J.(1992). Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the

- genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2180-2187.
- Díaz, M.; Peralta, E.L.; Iglesia, A; Sánchez,I.S.(1999). Morphological and serological variability of Cubans isolates of leaf scald disease. Abstracts of X Latinamerican Congress of Phytopathology, #164, Guadalajara, México.
- Egel, D.S., Graham, J.H., and Stall, R. E.(1991). Genomic relatedness of *Xanthomonas campestris* causing diseases of citrus. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 2724-2730.
- Giglioti, E.A., Díaz, R.M., Ciofi, J., Matsuoka, S., Masuda, Y., Hoffman, H.P.(2000). Sugarcane leaf scald disease: percentage of susceptible genotypes at seedling stage. XXIII Congress of Phytopathology., No. 130, Campinas, São Paulo., Brazil.
- Gilson, E., Clément, J.M., Brutlag, D., and Hofnung, M.(1984). A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in *E. coli*. *EMBO J.*3:1417-1421.
- Gilson, E., Clément, J.M., Perrin, D. and Hofnung, M.(1987). Palindromic units: a case of highly repetitive DNA sequences in bacteria. *Trends Genet.* 3:226-230.
- Griffithjones, M.D., Miller, D., Lilford, R.J., Scott, J., and Bulmer, J.(1992). Detection of fetal DNA in trans-cervical swabs from 1ST trimester pregnancies by gene amplification- a new route to prenatal-diagnosis. *British Journal of Obstetrics and Gynecology.*99: 508-511.
- Henson, J.M., and French, R.(1993). The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31: 81-109.
- Higgins, C.F., Ames, G.F., Barnes, W.M., and Hofnung, M.(1982). A novel intergenic regulatory element of prokaryotic operons. *Nature.* 298: 760-762.
- Hoffmann, H.P.(1989). Inoculação precoce de plântulas de cana-de-açúcar com *Xanthomonas albilineans* visando seleção para resistência. Diss MS, ESALQ/USP, Piracicaba, 91p.
- Hulton, C.S. J., Higgins, C.F., and Sharp, P.M.(1991). ERIC sequences: A novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and others enterobacteria. *Mol. Microbiol.*5:825-834.
- Kamoun, S, and Kado, C.I.(1990). A plant- inducible gene of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* encodes an exocellular component required for growth in the host and hypersensitivity on nonhost. *J. Bacteriol.* 172: 5165-5172.
- Koeuth, T., Versalovic, J., Lupski, J.R.(1995). Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome. Res.* 5: 408-418.
- Krawiec, S.(1985). Minireview. Concept of a bacterial species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35: 217-220.
- Krawiec, S., and Riley, M.(1990). Organization of the bacterial chromosome. *Microbiol. Ver.*54:502-539.
- Krepel, J.; Laur, I.; Sproston, A.; Luinstra, K.; Jang, D.; Mahony, j. and Chernesky, M.(1995). PCR and direct fluorescent-antibody staining confirm *Chlamydia trachomatis* antigens in swabs and urine below the detection threshold of Chlamydiazyme Enzyme Immunoassay. *J. Clinical Microbiol.* 33: 2847-2849.
- Lopes, S.A.(1996). *Xanthomonas albilineans*: detection, identification and infectivity titration in sugarcane. Dissertation for PhD in Plant Health. Department of Plant Pathology and Crop Physiology, Louisiana State University., 90p.
- Lopes, S.A., and Damann, K.E.(1996). Imunocaptura e detecção pela PCR de *Xanthomonas albilineans* em seiva vascular de folhas de cana-de-açúcar. *Summa Phytopathologica*, v.22, p.244-47.
- Lopes, S.A., Damann, K.E., Grelen, L.B.(1998). Comparison of methods for identification of the sugarcane pathogens *Xanthomonas albilineans*. *Summa Phytopathologica*, 24:114-119.

- Louws, F. J., Fulbrigh, D.W., Stephens, C.T., de Bruijn, F.J.(1994). Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2286-2295.
- Louws, F. J., Fulbrigh, D.W., Stephens, C. T., de Bruijn, F. J.(1995). Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*: *Phytopathol.* 85:528-536.
- Louws, F.J., Bell, J., Medina-Mora, C.M., Smart, C.D., Opgenorth, D.(1998).Rep-PCR mediated genomic fingerprinting: a rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathol.*88: 862-868.
- Louws, F.J., Rademaker, J.L.W., and de Bruijn, F.J.(1997).Rep-PCR: A rapid technique for bacterial identification and assessment of Genetic diversity. Workshop APS Annual Meeting.
- Lupski, J.R.(1993). Molecular epidemiology and its clinical applicaton. *JAMA* 270: 1363-1364.
- Lupski, J.R., and Weinstock, G.M.(1992).Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. Bacteriol.*174:4525-4529.
- Manulis, S., Valinsky, L., Lichter, A., and Gabriel, D.W.(1994). Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* with DNA primers and probes identified by random amplified polymorphic DNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4094-4099.
- Marquardth, O.; Straub, C.; Ahl, R.; and Haas, B.(1995).Detection of foot- and mouth disease virus in nasal swabs of asymptomatic cattle by RT-PCR within 24 hours. *J. Virol. Methods.*53: 255-261.
- Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J., Mitchell, T., Andrew, P., Prudhomme, M., Alloing, G., Hakenbeck, R., Morrison, D.A., Boulnois, G. J., and Claverys, J.P.(1992). A Highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleid Acids Res.* 20:3479-3483.
- Martin, D., Pazos, V., Peralta, E.L.(1999).Infecciones latentes de *Xanthomonas albilineans* en plantulas de caña de azúcar en Cuba. *Rev. Protección Veg.* 14: 123-130.
- Martin, J.P.and Robinson, P.E. (1961).Leaf scald. Pages 79-107, in: *Sugar Disease of the World*, Vol 1. J.P. Martin, E.V. Abbott, and C.G. Hughes, eds. Elsevier Publishing Co., Amsterdam.
- Masuda, Y.(1980). Aplicação da serologia na detecção de *Xanthomonas albilineans* em colmos de cana-de-açúcar. Piracicaba, ESALQ/USP, 113 pags. (Tese de Doutorado).
- Masuda, Y., Martins, S., Arizono, H., Barcelos, J.E.T., Abramo, J.F. Matsuoka, S. and Tokeshi, H.(1984). Seleção precoce de clones resistentes à Escaldadura das Folhas.Anais do 3th Congresso Nacional da STAB. V Convenção da ATALAC. Agosto de 1984. São Paulo, SP. Brazil, 235-238.
- Moss, A. and Haas, B.(1999). Comparison of the plaque test and reverse trascription nested PCR for the detection of FMDV in nasal swabs and probang samples. *J. Virol Methods.* 80: 59-67.
- North, D.S.(1926). Leaf scald, a bacterial disease of sugarcane. *Agric.Rep.No.8.* Colonial sugar Refining Co., Ltd., Sydney, Australia.
- Opgenorth, D.C., Smart, C.D., Louws, F.J., de Bruijn, F.J. and Kirkpatric, B.C.(1996). Identification of *Xanthomonas fragariae* field isolates by rep-PCR genomic fingerprinting. *Plant Dis.* 80: 868-873.
- Ouchterlony, D.(1958). Diffusion in gel methods for immunological analysis *Progress in Allergy.* 5: 1-78.
- Pan, Y.B.; Grisham, M.P., and Burner, D.M.(1997). A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of sugarcane leaf scald disease. *Plant Dis.* 81: 189-94.
- Pan, Y.D., Grisham, M.P., Burner, D.M., Legendre, B.L. and Wei, Q.(1999). Development of Polymerase Chain Reaction Primers highly specific for *Xanthomonas albilineans*, the causal bacterium of sugarcane leaf scald disease. *Plant. Dis.* 83: 218-222.

- Peralta, E.L. and Villoch, A.(1999).Validación de ensayos inmunoquímicos y moleculares utilizados para el diagnostico de fitopatógenos. Resúmenes del X Congreso Latinoamericano de Fitopatología, #153, Guadalajara, México.
- Peralta, E.L., Martínez, B., Martín, D., and Jones, P. (1997). Quality control for the production of pathogen-free plantlets in Cuban sugarcane biofactories . ISSCT Pathology and Molecular Biology Workshop, Abstracts, South Africa, May, 1997.
- Permaul, K., Pillay, D. and Pillay, B.(1996).Random- amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis shows intraspecific differences among *Xanthomonas albilineans* strains.Letters in Applied Microbiol. 23: 307-311.
- Pooler, M.R., Ritchie, D.F., and Hartung, J.S.(1996). Geneteic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on Random Amplified Polymorphic DNA PCR, Repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR data and generation of multiplex PCR primers useful for the identification of this phytopathogen. Appl. Environ. Microbiol. 62: 3131-3127.
- Ricaud, C., and Ryan, C.C. (1989). Leaf scald; In: Disease of sugarcane. Major diseases. Eds: C Ricaud, BT Egan, AG Gillaspie Jr &C.G Hughes. Amsterdam. The Netherlands: Elsevier Science Publishers: 39-58
- Rivera, N.; Rodriguez, I.; Esavín, M. and Marrero, O.(1987).Epidemiology of leaf scald and gumming disease of sugar cane in Cuba and biology of their causal agents.Procedings 18th ISSCT Congress, p.821-835.
- Root, P.(1995). Leaf scald of sugarcane.Agriculture and Developpment; CIRAD-CA, 51-58.
- Rott, P., and Chatenet, M.(1998). Genetic diversity and variability in pathogenicity of Xa. Annual Report Sugarcane. CIRAD. Montpellier. France.p.27.
- Rott, P., and Feldman, P.(1991). Les maladies de la canne a sucre en Guadeloupe: situation actulle et méthodes mises en place. Pages 90-94, in: Rencontres Internationales en Langue Française de la Canne á sucre, Nogent- Sur- Mame, France.
- Rott, P., Arnaud, M., and Baudin, P.(1986). Serological and lysotypical variability of *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, causal agent of sugarcane scald disease. Journal of Phytopathol. 116: 201-211.
- Rott, P., Davis, M.J., and Baudin, P.(1994). Serological variability in *Xanthomonas albilineans*, causal agent of leaf scald disease of sugarcane. Plant Pathol. 43: 344-349.
- Rott, P., Soupa, D., Brunet, Y., Feldmann, P., and Letourmy, P.(1995). Leaf scald (*Xanthomonas albilineans*) incidence and its effect on yield in seven sugarcane cultivars in Guadeloupe. Plant Pathol. 44: 1075-1084.
- Rott, P.C., Costest, L., Davis, M.J., Frutos, R., Gabriel, D.W.(1996).At least two separate gene clusters are involved in albicidin production by *Xanthomonas albilineans*. J. Of Bacterol.178: 4590-4596.
- Sanguino, A., de Moraes, V.A. and Santos Filho, O.T.(1984). Diagnóstico do raquitismo da soqueira em colmos de cana de açúcar. II Seminário de Tecnologia Agronômica.
- Stone,G.;Oberst,R.;Hays,M.;McVey,S.;Galland,J.,Curtiss II, R., Kelly,S. andShengappa,M.(1995).Detection of *Salmonella typhimurium* from rectal swabs of experimental infected beagles by short cultivation and PCR hybridization. J. Clinical Microbiol. 33:1292-1295.
- Sykes, J.E.; Studdert, V.P.; and Browning, G.F.(1998).Detection and strain differentiation of feline calicivirus in conjunctival swabs by TR-PCR of the hypervariable region of the capsid protein gene. Arch Virol.,143: 1321-1334.

- Ushijima, H.; Xin, K-Q., Nishimura, S.; Morikawa, S. and Abe, T. (1994). Detection and sequencing of Rotavirus VP7 gene from human materials (Stools, Sera, Cerebrospinal fluids, and Throat swabs) by Reverse transcription and PCR. *J. Clinical Microbiol.* 32: 2893-2897.
- Van der Schee, C., van Belkum, A., Zwiijgers, L, van der Brugge, E., O'Neill E.L., Luijendijk, A., van Rijsoort-Vos, T. Van der Meijden, W.I., Verbrugh, H., d Sluiters, H.J.F. (1999). Improved diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection by PCR using vaginal swabs and urine specimens compared to diagnosis by wet mount microscopy, culture, and fluorescent staining. *J. Clinical Microbiol.* 37: 4127-4130.
- Vera Cruz, C.M., Ardales, E.Y., Skinner, D. Z., Talag, J., Nelson, R. J., Louws, F.J., Leung, H., Mew, T.W., Leach, J.E. (1996). Measurement of haplotypic variation in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* within a single field by rep-PCR and RFLP analyses. *Phytopatho.* 86: 1352 - 1359.
- Versalovic, J., Koeuth, T. ,and Lupski, J.R. (1991). Distribution of repetitive Dna sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19: 6823-6831.
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F. J., and Lupski, J.R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell. Biol.* 5:25-40.
- Vitale, F.; Capra, G.; Maxia, L.; Reale, S.; Vesco, G., and Caracappa, S. (1998). Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Cattle by PCR using milk, lymph node aspirates, and nasal swabs. *J. Clinical Microbiol.* 36. 4: 1050-1055.
- Wang, ZK.; Comstock, E.; Hatziloukas and Schaad, NW. (1999). Comparison of PCR, Bio-PCR, DIA, ELISA and isolation on semiselective medium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald. *Plant Pathol.* 48:245-252.
- Wilbrink, G. (1920). De Gomziekte van het Suikerriet, hare Oorzaak en hare Bestrijding. *Arch. Suikerind. Ned. Indie.* 28:1399-1525.
- Windsor, H.M., Ho, G.Y., Laurence, B.H., Cullen, D.J.E., MacQuillan, G.C., and Marshall, B.J. (1998). Transport of gastric mucus on dry cotton swabs does not affect detection of H-pylori. *Gastroenterology.* 114:(4) G1357, Part 2, Suppl. S APR 15, 1998.
- Yang, P., Rott, P., Vauterin, L., Hoste, B., Baudin, P., Kersters, K., and Swings, J. (1993). Intraspecific variability of *Xanthomonas albilineans*. *Syst. Appl. Microbiol.* 16:420-426.

ANEXOS

Tabla 1. Aislamientos de *X. albilineans* obtenidos durante la fase latente y el brote actual de la enfermedad a partir de variedades de caña de azúcar procedentes de diferentes localidades.

PROVINCIA	SÍNTOMAS	VARIEDAD	IDENTIFICACIÓN DEL AISLAMIENTO	
Matanzas	SF, BL,SIT, MuT	L55-5	C1 (H)*, C2 (Br)*, C3 y C4 (T)*	
	BL	C290-73	C5 y C6 (T)*	
	SF,BL,SIT,MuT	C120-78	C7 (H)*, C8 (Br)*, C9 y C10 (T)*	
	SF,BL,SIT,MuT	Q124	C11 (T)	
	(1)	Q49	C12 (T)	
	(1)	C517-72	C13 (T)	
	SF,BL,SIT	CSG21-91	C14 (H), C15 (Br), C16 (T)	
	SF,BL,SIT	CSG304-92	C17 (T)	
	SF,BL,SIT	CSG285-92	C18 (T)	
	SF,BL,SIT	CSG278-92	C19 (H), C20 (Br), C21 (T)	
	SF,BL,SIT	CSG339-92	C22 (Br)	
	SF,BL,SIT	C86-199	C23 (T)	
	SF,BL,SIT	CSG189-92	C24 (T)	
	SF,BL,SIT	CSG185-92	C25 (T)	
	SF,BL,SIT	EPC73-356	C26 (Br)	
	SF,BL,SIT	C86-1519	C27 (T)	
	SF,BL,SIT	CP63-346	C28 (Br)	
	SF,BL,SIT	CP66-346	C29 (Br)	
	SF,BLSIT	CP61-81	C30 (T)	
	SF,BL,SIT	CP82-1051	C31(T)	
	SF,BL,SIT	RB72-454	C32 (Br), C33 (T)*	
	SF,BL,SIT	C323-68	C34 (T)*	
	SF,BL,SIT	CP82-1328	C35 (Br)	
	SF,BL,SIT	C88-382	C36 (T)	
	SF,BL,SIT	CSG36-92	C37 (T)	
			Líneas de saneamiento (L55-5)	C61 (Th), C62 (Cm)
		SS	Ja60-5	
		SS		L2
	Pinar del Río	SF	C86-12	C38 (H)
		SF	C86-503	C39 (H)

	SF	Ja64-19	C40 (H)
La Habana	SF,BL,SIT	C323-68	C41 (T)*
	SF,BL,SIT	RB72454	C50 (T)*
	SF	C1051-73	C42 (H)
	BL,SIT	Ja60-5	C44 (T)*,C45 (Br)*
	SF,BL	C120-78	C47 (Br)*
	SF	Ja 64-19	C48 (T)*
	SF	B80509	C49 (H)
	SF	Co997	C43 (H)
	SF	C111-79	C46 (H)
	SF	Ty86-28	C52 (H)
	SF	CP52-43	C53 (H)
	SF	B77418	C54 (H)
	SF	SC83-27	C51 (H)
Villa Clara	SS	RB72454	L1
	SS	C323-68	L3
Camagüey	SF,BL,SIT	C88-382	C55 (T)*
	SF,BL,SIT	C229-84	C56 (H)
		Cuarentena**	C57 y C58 (T)
Ciego de Ávila	SF,BL,SIT	C1051-73	C59 (T)*
Las Tunas	SF,SIT	C87-51	C60 (H)

Leyenda:

SS: Sin síntomas.

SF: Síntomas foliares (presencia de rayas blancas de ancho variable; necrosis foliar).

BL: desarrollo de brotes laterales desde la base del tallo, con la presencia, por lo general, de rayas blancas finas en las hojas de los brotes.

SIT: Síntomas internos de los tallos (haces vasculares de coloración roja).

MuT: Muerte de tallos.

(1): Estas variedades presentaron síntomas típicos y fueron cortadas. Se muestrearon dos meses después del corte, sin síntomas visibles.

*: Aislamientos utilizados para la caracterización morfológica, bioquímica y patogénica.

** : Aislamientos recibidos del Laboratorio Central de cuarentena sin otras referencias.

H: Hojas

T: Tallos

Br: Brotes

Th: Tratamiento hidrotérmico

Cm: Cultivo de meristemas

Tabla 2. Cepas de referencia de *X. albilineans* y otras especies utilizadas en los estudios de caracterización y diversidad.

CEPA	COLECCIÓN	ORIGEN	GRUPO	
			GENOMICO	SEROVAR
5089 (R1)	IBC	Brasil	B-01	1
SA (R2)	ESSC	África del Sur	-	1
2390 (R3)	INRA, Angers	Francia	-	-
2375 (R4)	INRA, Angers	Francia	-	-
USA-019 A (R5)	CCBP	Florida, E.U.A.	A-01	1
DOM-097 A (R6)	CCBP	Rep.Dominicana	A-01	1
USA-016 A (R7)	CCBP	Texas, E.U.A.	B-01	1
USA-128 A (R8)	CCBP	Florida, E.U.A.	B-01	-
GLP-094 A (R9)	CCBP	Guadalupe.	B-06	1
HVO-031A(R10)	CCBP	Burkina Fasso	C-02	2
RFU-008 A(R11)	CCBP	Reunión.	D-01	3
GLP-094 A(R12)	CCBP	Guadalupe.	E-01	3
HVO-005A(R13)	CCBP	Burkina Fasso.	F-01	2
LKA-070 A(R14)	CCBP	Sri Lanka.	G-01	3
PNG-144A(R15)	CCBP	Papua N.Guinea	H-01	1
2382 (R16)	INRA, Angers	Francia	-	-
Br1	LAFIMEG	Brasil	-	-
Br2	LAFIMEG	Brasil	-	-
Br3	LAFIMEG	Brasil	-	-
Br4	LAFIMEG	Brasil	-	-
Br5	LAFIMEG	Brasil	-	-
Br6	LAFIMEG	Brasil	-	-
Br7	LAFIMEG	Brasil	-	-
Br8	LAFIMEG	Brasil	-	-
LGM-471 (S1) (<i>X.sacchari</i>)	IBC	Guadalupe	-	-

656 (S2) (<i>X.campestris</i>)	IBC	Brasil	-	-
1289 (S3) (<i>X.axonopodis</i> pv. <i>vascolorum</i>)	CCBP	Angers, Francia	-	-
BR2 (S4) (<i>X. sp.</i> , Falsa raya roja).	IBC	Brasil	-	-
<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (S5, S6 y S7)	BSES IBC LBV	Australia Brasil Cuba	- - -	- - -

Leyenda: IBC = Instituto Biológico de Campinas, Sao Paulo, Brasil; ESSC = Estación Experimental de Caña de Azúcar, Africa del Sur; CCBP= Colección CIRAD-CA de Bacterias Fitopatógenas, Montpellier, Francia; LAFIMEG= Laboratorio de Fitopatología Molecular e Ingeniería Genética, Araras, Brasil; BSES= Buró de Estaciones Experimentales de Caña de azúcar, Australia; LBV = Laboratorio de Bacteriología Vegetal, CENSA.

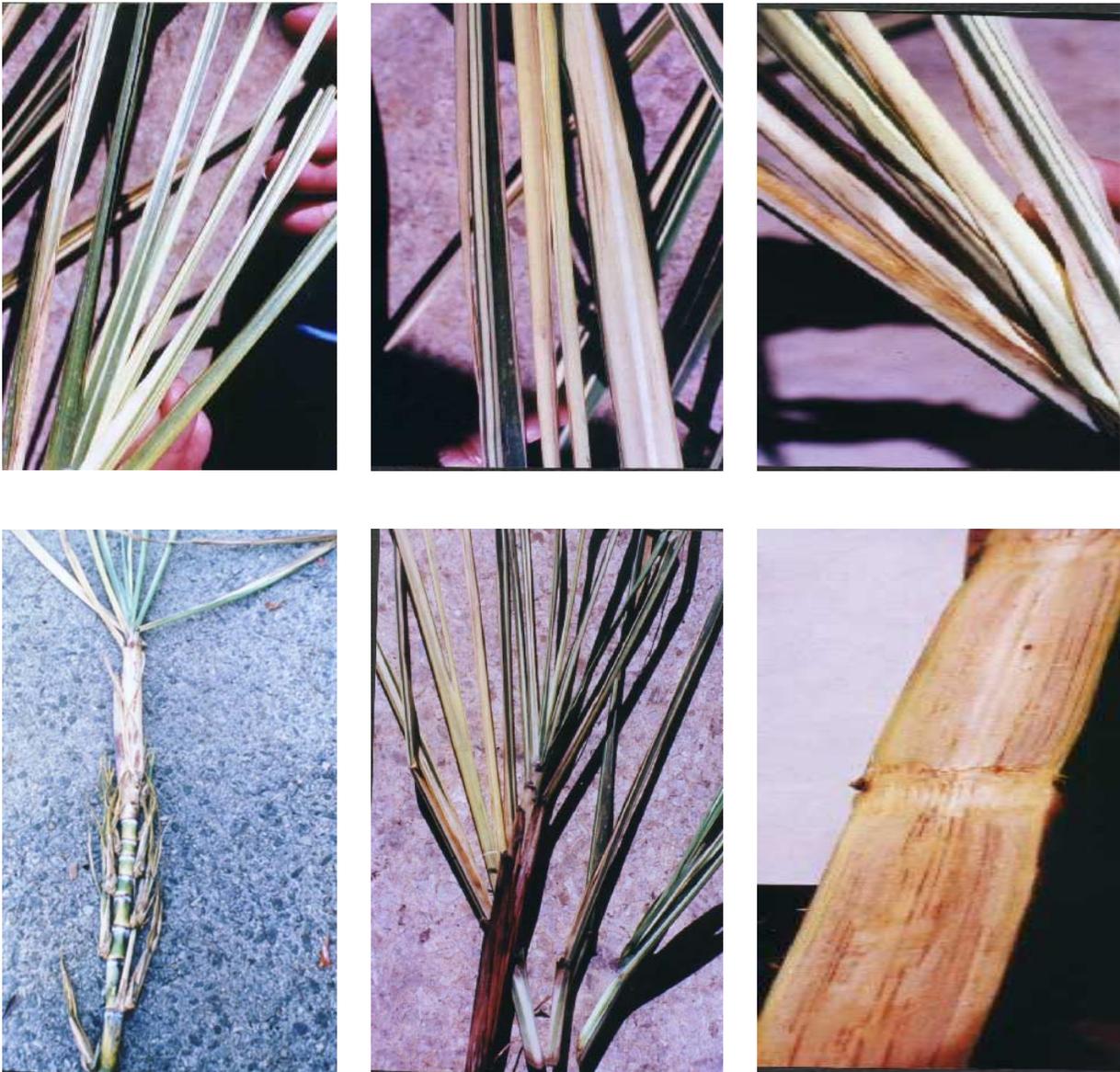


Figura 1. Principales síntomas observados en cañas enfermas con escaldadura foliar en la EPICA "Antonio Mesa" (variedades L 55-5, C 120-78).

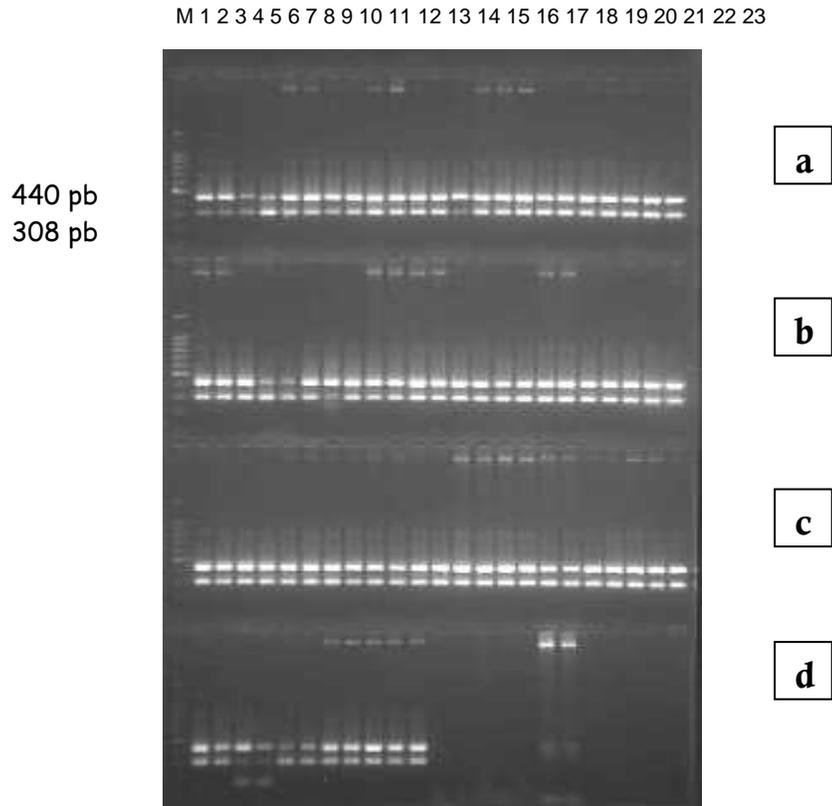
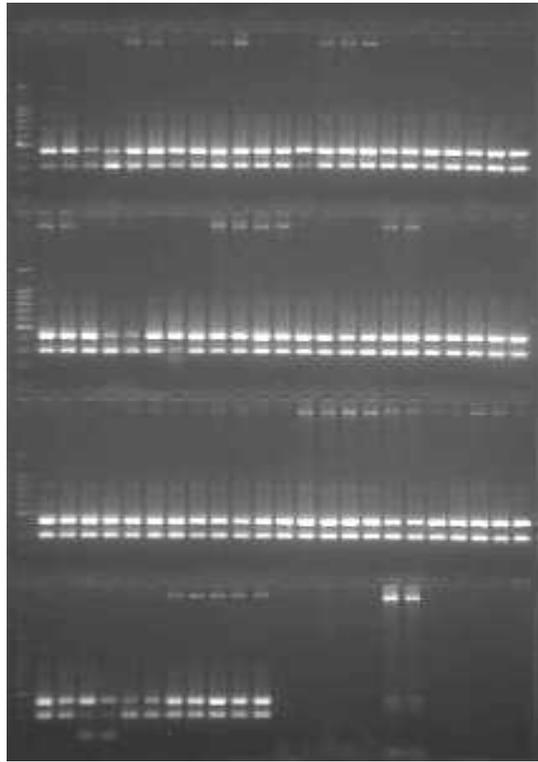


Figura 2. Identificación de los aislamientos cubanos de *X. albilineans* mediante n-PCR
 a) 1-15 (R1-R15); 16-18 (L1-L3); 19-23 (C1-C5); b) 1-23 (C6-C28); c) 1-23 (C29-C51); d) 1-11 (C52-C62); 12-18 (S1-S7)

440 pb
308 pb



a

b

c

d

• 40°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Producción de ácidos a partir de carbohidratos:</i>																							
• <i>gluc/sacarosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
• <i>manosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
• <i>lactosa/maltosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
• <i>fructuosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
• <i>xilosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
• <i>sorbitol</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
• <i>celobiosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
• <i>inositol</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
• <i>arabinosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda:

O: oxidativo

+: reacción positiva

-: reacción negativa

(d): del 11 al 89% de los aislamientos son negativos para la especie

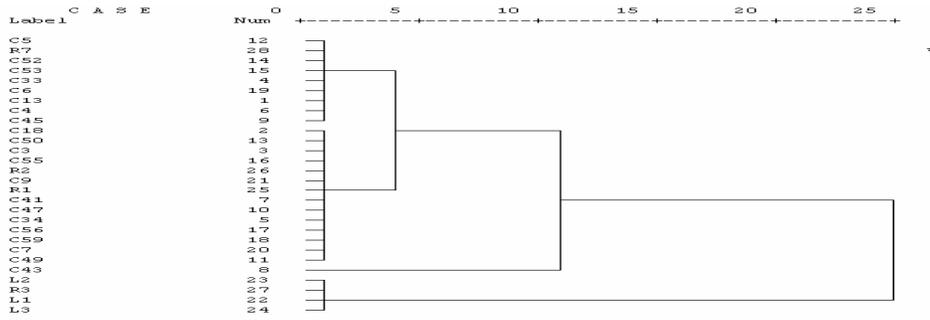


Figura 3. Dendrograma que muestra el comportamiento de diferentes aislamientos cubanos frente al antisuero de la cepa R7 (AsR7). Se distingue la diferenciación de los aislamientos de la fase latente, poniéndose en evidencia además diferencias entre los aislamientos del brote actual en su reacción con este antisuero.

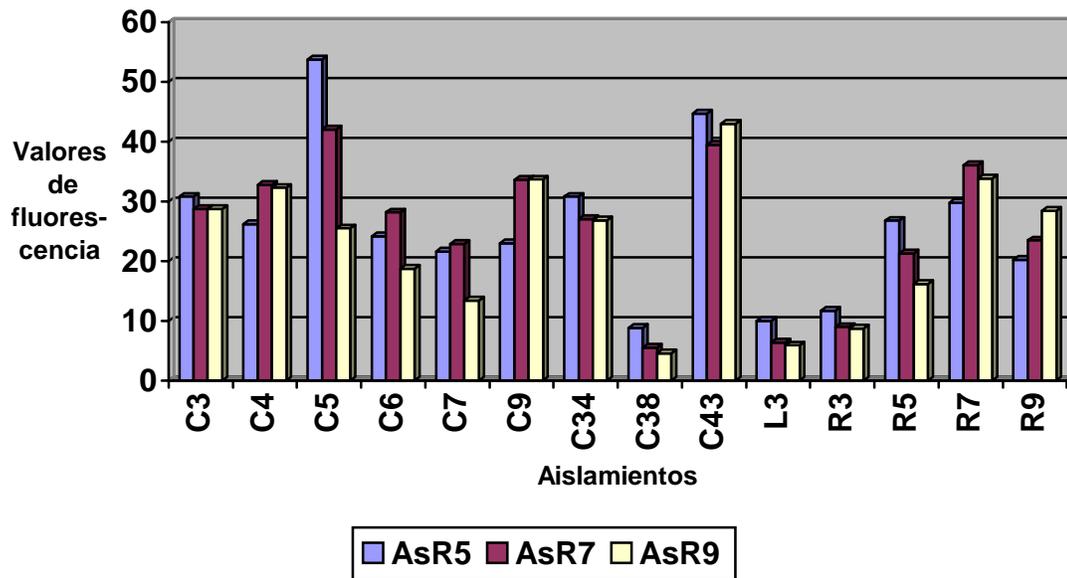
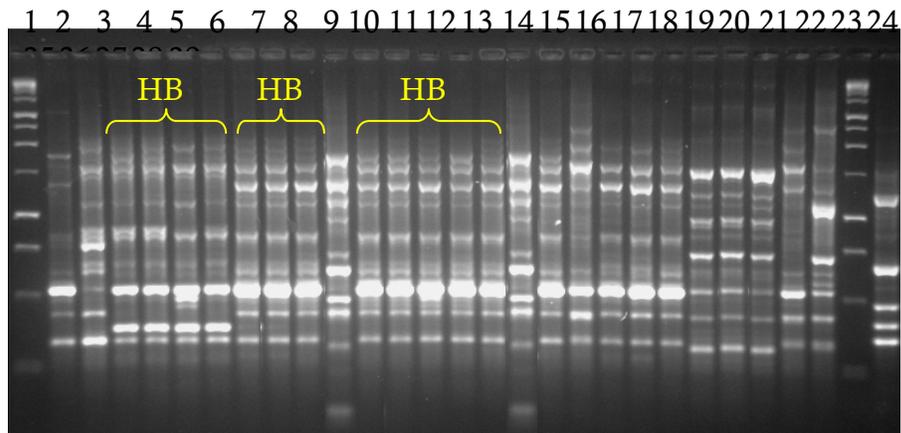


Figura 4. Variaciones intraespecíficas detectadas en aislamientos cubanos y cepas de referencia pertenecientes al serovar I mediante UMELISA Iindirecto. En la figura aparecen algunas de las cepas de referencia y aislamientos evaluados, en las que puede apreciarse un comportamiento diferente de los aislamientos y cepas de referencia con respecto a los distintos antisueros utilizados. C38, L3 y R3 no pertenecen al serovar I.

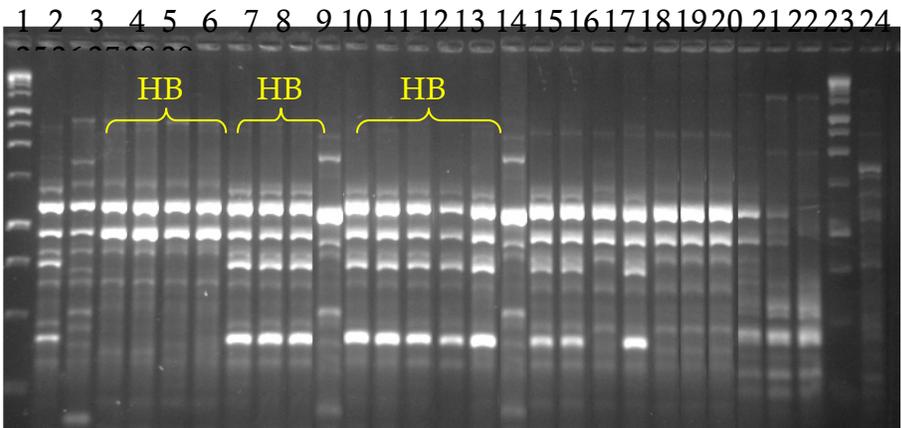
Figura 5: Patrones característicos de los aislamientos cubanos de *X. albilineans* seleccionados (A: BOX; B: ERIC).

De izquierda a derecha:

- Marcador 1Kb
- Aislamientos de referencia R1, R2, R3, R4 y R16 (Brasil, A. Sur y Francia)
- Aislamientos cubanos: L2, C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C34, C33, C47, C50, C41, C44, C45, C48, C55, C59
- Marcador 1Kb
- *X.c.pv. vasculorum* (S3)



A



B

Tabla 4. Grupos genómicos establecidos entre los aislamientos de *X. albilineans* mediante la utilización de los iniciadores BOX, ERIC y REP (rep-PCR).

Identificación de los grupos genómicos(GG)	DESCRIPCIÓN DEL GG			Aislamientos	Localidades
	BOX	ERIC	REP		
GG-1	HB1	HE1	HR1	L1, L2, L3	M(1), VC(2)
GG-2	HB2	HE2	HR2	C1,C2,C3,C5, C6,C7,C8,C9, C11,C22,C26, C28,C39,C53, C60,C61,C62	PR(1), H(1),M(14), T(1)
GG-3	HB3	HE3	HR3	C4,C10	M(2)
GG-4	HB2	HE2	HR4	C12,C13,C17, C19,C20,C21, C24,C25,C27, C29,C30,C32, C33,C34,C35, C38,C43,C46, C50,C51,C57, C58	PR(1), H(4),M(15), C(2)
GG-5	HB4	HE5	HR2	C14,C15,C16, C18	M(4)
GG-6	HB5	HE5	HR5	C23,C31,C37, C59	M(3), CA(1)
GG-7	HB2	HE5	HR2	C36,C52,C55, C56	H(1), M(1), C(2)
GG-8	HB2	HE4	HR2	C40	PR(1)
GG-9	HB2	HE4	HR4	C41,C42,C47	H(3)
GG-10	HB6	HE4	HR6	C44,C45,C48	H(3)
GG-11	HB7	HE5	HR2	C49,C54	H(2)
GG-12	HB8	HE2	HR7	Br1,Br2,Br5, Br7	Brasil
GG-13	HB9	HE2	HR8	Brr3,B4,Br6, Br8	Brasil
GG-14	HB10	HE6	HR9	R1	Brasil
GG-15	HB11	HE7	HR10	R2	Africa del Sur
GG-16	HB1	HE1	HR11	R3,R4	Francia
GG-17	HB1	HE1	HR12	R16	Francia
GG-18	HB14	HE8	HR13	R5,R6	Florida, R. Dominicana
GG-19	HB2	HE2	HR14	R7	Texas

GG-20	HB2	HE2	HR15	R8	Florida
GG-21	HB15	HE9	HR16	R9	Guadalupe
GG-22	HB16	HE10	HR17	R10	B. Faso
GG-23	HB17	HE10	HR18	R11	Reunión
GG-24	HB18	HE11	HR19	R12	Guadalupe
GG-25	HB19	HE12	HR20	R13	B. Faso
GG-26	HB20	HE11	HR21	R14	Sri Lanka
GG-27	HB21	HE12	HR22	R15	P. New Guinea

PR (Pinar del Río), H (Habana), M(Matanzas), C(Camagüey), CA(Ciego de Ávila), T (Tunas)

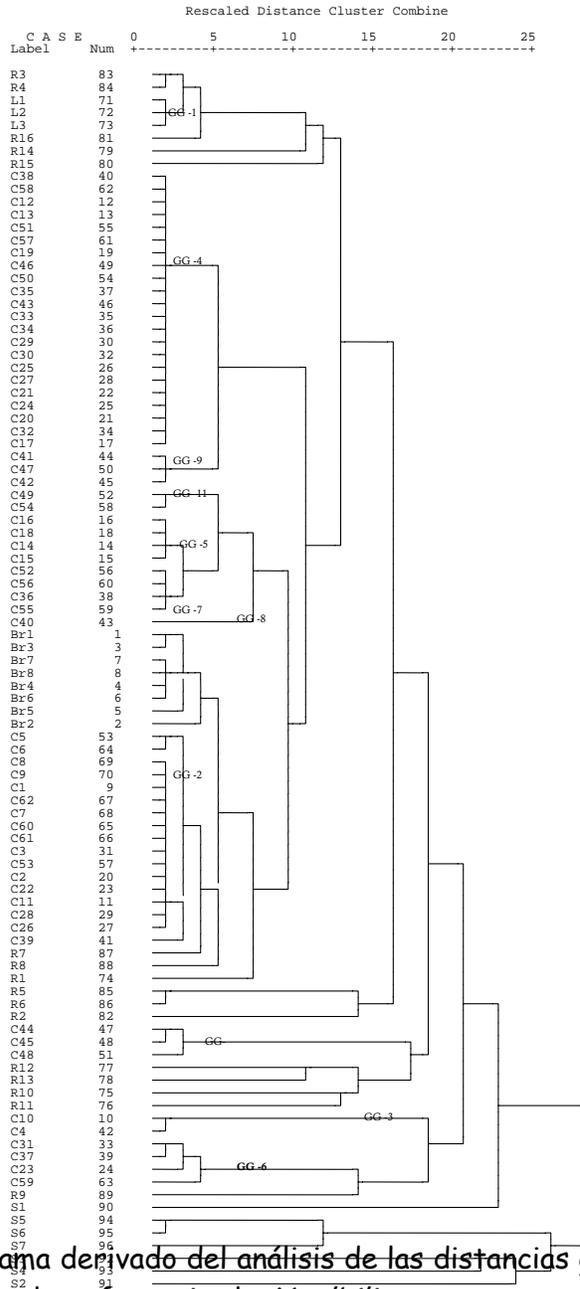


Figura 6. Dendrograma derivado del análisis de las distancias genéticas entre los aislamientos cubanos y las cepas de referencia de *X. albilineans* y otras especies patógenas a la caña de azúcar. Se señalan los grupos genómicos establecidos entre los aislamientos cubanos.

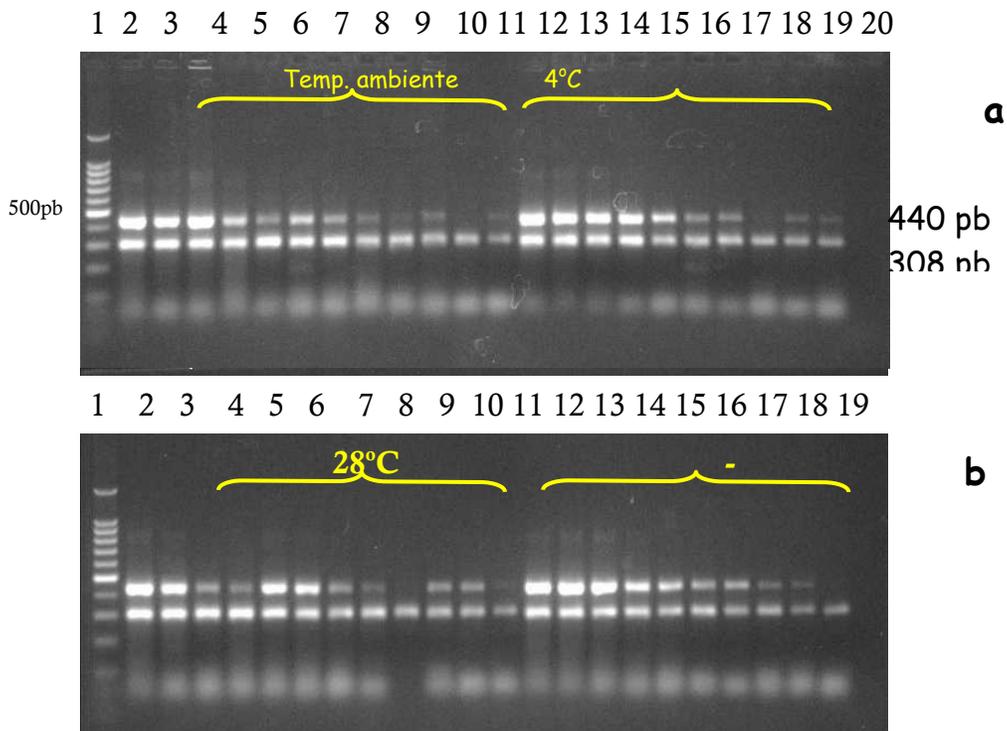


Figura 7. Evaluación mediante n-PCR de muestras y suspensiones de *X. albilineans* conservadas en aplicadores de algodón durante 60 días a temperatura ambiente, 4°C (a), 28°C y -20°C (b). Carril 1 de ambas: marcador de 100 pb; carriles 2-3 de ambas: suspensión bacteriana y ADN de C9; a) Carriles 4-13: diluciones de muestras mantenidas a temperatura ambiente y a 4°C (del 14 -23); b) Carriles 4-13: diluciones de muestras mantenidas a 28°C y a -20°C (del 14 -23).

Tabla 5. Parámetros de evaluación determinados para la detección de *X.albilineans* mediante n-PCR.

Indicadores de validación	n-PCR sin utilizar aplicadores	n-PCR utilizando aplicadores	Aislamiento "in vitro"
Especificidad	100%	100%	100%
Sensibilidad	98.3%	95%	98.3%
Eficacia	99.16%	97.5%	99.16%
Valor predictivo positivo	100%	100%	100%
Valor predictivo negativo	98.36%	95.23%	100%

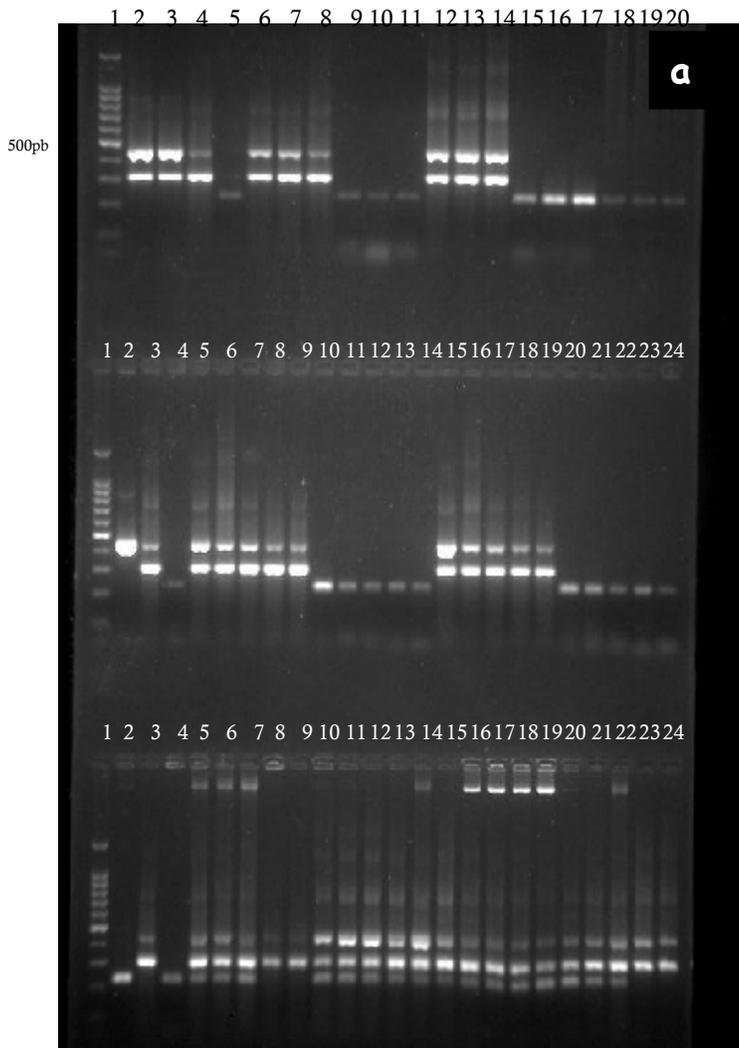


Figura 8. Resultados de la detección simultánea de *X. albilineans* y *L.x. subsp. xyli*.

- 1) Carriles 2-3: ADN y suspensión bacteriana de C9; 4: jugo de planta con escaldadura; 5: jugo de planta con RSD; 6-8: jugo de plantas con escaldadura, extraído con pinzas y mantenidos a t.a.; 9-11: iguales condiciones para RSD; 12-14: jugo de plantas con escaldadura extraído por centrifugación y mantenidos a t.a.; 15-17: iguales condiciones con RSD.
- 2) Carriles 2-3: controles positivos de *X.albilineans*; 4: control positivo de *L.x.subsp. xyli*; diluciones en agua de jugos de plantas infectadas por escaldadura mantenidas a temperatura ambiente (carriles 5-9) y a -20° C. Iguales condiciones para jugos de plantas con RSD (carriles 10-14 y del 20-24).
- 3) Carril 2: suspensión bacteriana de *L.x. subsp. xyli*; 3-4: jugos frescos de plantas con escaldadura y RSD respectivamente; muestras en las que se mezcló en distintas proporciones jugo de ambas enfermedades mantenidas a temperatura ambiente.