



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN

PROGRAMA DE MAESTRÍA DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN EN
AGRICULTURA TROPICAL SOSTENIBLE

ESTUDIO DE LA TRANSMISIÓN DEL VIRUS DEL SÍNDROME DE LA HOJA
AMARILLA (SeYLV) POR INSECTOS EN CAÑA DE AZÚCAR

POR:
EDGAR ELOY ORELLANA HIDALGO

Guayaquil, Ecuador
2004





UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN

PROGRAMA DE MAESTRÍA DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN EN
AGRICULTURA TROPICAL SOSTENIBLE

Rectores:

Dr. M. Sc. Carlos Cedeño Navarrete – U. G.

Dr. Moisés Teclé Galárraga – ESPOL

Director Postgrado:

Econ. M. Sc. Washington Aguirre García – U. G.

Decanos:

Ing. José Cuenca Vargas – CC.NN – U. G.

M. Sc. Eduardo Rivadeneira Pazmiño – FIMCP – ESPOL

Director de Maestría:

Dr. Wilson Pozo Guerrero

Directora Académica:

Dra. Carmen Triviño Gilces

Queda prohibida la reproducción o transmisión total o parcial del contenido de la presente obra en cualquier forma, sea electrónica o mecánica sin el consentimiento del autor.

Ing. Agr. Edgar Eloy Orellana Hidalgo

E-mail: eorellana@valdez.com.ec / eloy_agro@hotmail.com

Maestría en Ciencias en Agricultura Tropical Sostenible

facecnn@telconet.net Telf.: 04-2494270

Guayaquil, Ecuador





UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN

PROGRAMA DE MAESTRÍA DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN EN
AGRICULTURA TROPICAL SOSTENIBLE

ESTUDIO DE LA TRANSMISIÓN DEL VIRUS DEL SÍNDROME DE LA HOJA
AMARILLA (ScYLV) POR INSECTOS EN CAÑA DE AZÚCAR

POR:

EDGAR ELOY ORELLANA HIDALGO

Esta tesis fue aceptada en su presente forma por la Escuela de Postgrado de la Universidad de Guayaquil y la Escuela Superior Politécnica del Litoral y aprobada por el Comité Consejero del estudiante y Comisión de Estudios de Postgrado, como requisito parcial para optar el título de:

"Magister Scientiae"

COMITÉ CONSEJERO:

Freddy Garcés Obando, I. A. M. Sc. (c)

Jorge Mendoza Mora, I. A. M. Sc.

COMISIÓN DE ESTUDIOS:

Carmen Triviño Gilces, Ph. D.

Gilberto Páez Bogarin, Ph. D.

Wilson Pozo Guerrero, Ph. D. (c)





Guayaquil, Ecuador

2004



DEDICATORIA

A todas y cada una de las personas que rompen paradigmas, logrando distinción y autoestima en este mundo tan convulsionado.

AGRADECIMIENTO

El autor deja constancia de su más sincero agradecimiento y debido reconocimiento a todas aquellas personas e instituciones que contribuyeron en el presente trabajo científico.

Agradezco a DIOS creador del universo, que me dió y me seguirá dando fortaleza para seguir adelante todos los días.

Agradezco a mi familiares que siempre están presente con mis ideas, y juegan un papel muy importante en la toma de decisiones, su apoyo es de suma importancia.

A las personas que colaboraron en la unidad de Post Grado de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Guayaquil.

Agradezco la ayuda incondicional de los Ingenieros Freddy Garcés y Jorge Mendoza, Bióloga Carmen Valladares, Tecnólogo Goevanny Quiridumbay y todo el personal de campo y laboratorio de los departamentos de Fitopatología y Entomología del CINCAE.

No puedo dejar de mencionar las siguientes personas que me brindaron su apoyo, tiempo y experiencia sin ningún tipo de interés en el presente trabajo de investigativo.

Dra. Carmen Triviño Gilces
Ing. Reyna Medina Litardo
Blga. Carmen Muñoz López
Ing. Saúl Mestanza Velasco
Ing. Daniel Navia Santillán

Mil gracias a todos,

BIOGRAFÍA

Nací en la ciudad de El Triunfo, Provincia de Guayas, el 10 de Noviembre del 1981. Mis padres son el Sr. Eloy Orellana Montesdeoca y la Sra. Narcisa Hidalgo de Orellana.

Mis estudios primarios y secundarios los realicé en mi ciudad natal donde obtuve el título de Bachiller Técnico Agropecuario especialización Agrícola, en el Colegio Nacional Técnico Agropecuario El Triunfo, además obtuve el mérito al Mejor Bachiller de la Decimoctava promoción en el año 1997. Para entonces ya había tomado la decisión de seguir una carrera agronómica.

Ingrese a estudiar en la Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Agrarias, siendo en esta institución donde obtuve la designación de mejor Egresado en el año 2002.

Un año más tarde, después de una meticulosa investigación en el área social del sector bananero culminé la Tesis de Grado, la cual fue designada la mejor del año, obteniendo el Premio Universidad de Guayaquil. Cumplidos todos los requisitos fui investido de Ingeniero Agrónomo.

Una vez terminada la carrera de ingeniería me dispuse a cursar los estudios de Post Grado becado por la Universidad de Guayaquil, donde, terminada la parte Académica, obtuve el título de Especialista en Agricultura Tropical Sostenible en el 2004, año que también ingresé como investigador al Centro de Investigación de la Caña de Azúcar (CINCAE) para realizar un Estudio Epidemiológico del Virus de la Hoja Amarilla en el cultivo de Caña de Azúcar, siendo el tema del presente trabajo investigativo.

Uno de los aspectos más gratificantes de mi trabajo ha sido la interacción con un grupo inmejorable de colegas y amigos de la comunidad de científicos e investigadores involucrados con el agro, valoro en verdad estas amistades, que han perdurado por años y espero que se mantengan por muchos más.

CONTENIDO

	Página
Portada	i
Autoridades	ii
Aprobación	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimiento	v
Biografía	vi
Contenido	vii
Resumen	x
Summary	xi
Lista de cuadros	xii
Lista de figuras	xiii
Tema:	
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos	2
1.1.1. General	2
1.1.2. Específico	2
1.2. Hipótesis	2
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Sintomatología de la enfermedad	3
2.2. Importancia de la enfermedad	3
2.2.1. Distribución e incidencia	3
2.2.2. Efecto en la producción	4
2.3. Agente causal	4
2.3.1. Clasificación	5
2.3.2. Característica	5
2.3.3. Razas	5
2.4. Diagnóstico	6
2.5. Transmisión del virus	7
2.5.1. Mecanismos de transmisión	7
2.5.2. Transmisión por vectores	7
2.5.3. Transmisión del virus en caña de azúcar	8
2.6. Descripción de los vector	8

2.6.1.	Descripción y bioecología del áfido blanco de la caña de azúcar	8
2.6.2.	Descripción y bioecología del saltahoja hawaiano	9
3.	MATERIALES Y METODOS	11
3.1.	Localización	11
3.2.	Materiales	11
3.3.	Establecimiento y mantenimiento de colonias	12
3.3.1.	Áfido blanco de la caña de azúcar <i>M. sacchari</i>	12
3.3.2.	Saltahojas hawaiano, <i>Perkinsiella saccharicida</i>	12
3.4.	Técnicas inmunoenzimáticas para detectar el ScYLV	14
3.4.1.	Técnica de diagnóstico Tissue – Blot inmuno assay (TBIA)	14
3.4.2.	Establecimiento de técnica de diagnóstico Dot Blot inmuno assay (DBIA)	15
3.5.	Obtención de plantas sana y enfermas	16
3.6.	Bioensayo de transmisión del virus por <i>M. sacchari</i> y <i>P. saccharicida</i>	17
3.6.1.	Periodo de ayuno de <i>Melanaphis sacchari</i> previo a adquirir ScYLV	18
3.6.2.	Periodo de acceso a la adquisición del virus ScYLV por <i>Melanaphis sacchari</i>	18
3.6.3.	Periodo de acceso a la inoculación del virus ScYLV por <i>Melanaphis sacchari</i>	19
3.7.	Preferencia del vector	19
3.8.	Análisis estadístico	21
3.8.1.	Bioensayos de transmisión de ScYLV	21
3.8.2.	Preferencia del insecto	23
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
4.1.	Capacidad de transmisión del virus de la hoja amarilla en caña de azúcar por <i>M. sacchari</i> y <i>P. Saccharicida</i> .	25
4.1.1.	Establecimiento y mantenimiento de colonias	25
4.1.2.	Selección de plantas sanas y enfermas para la transmisión	26
4.1.3.	Establecimiento de la técnica de diagnóstico	27
4.1.4.	Ensayo de transmisión del virus por <i>M. sacchari</i> y <i>P. saccharicida</i>	27
4.2.	Desarrollo de metodología para transmitir el virus de la hoja amarilla (ScYLV)	29
4.2.1.	Periodos de ayuno <i>Melanaphis sacchari</i>	29
4.2.2.	Periodos de acceso a la adquisición del virus ScYLV por <i>Melanaphis sacchari</i>	30

4.2.3. Periodos de acceso a la Inoculación del virus ScYLV por <i>Melanaphis sacchari</i> .	30
4.3. Grado de preferencia del vector en cinco variedades comerciales y ocho clones ECSP del CINCAE.	32
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	34
5.1. Conclusiones	34
5.2. Recomendaciones	34
6. BIBLIOGRAFÍA	35
ANEXOS	39

RESUMEN

En Ecuador el cultivo de la caña de azúcar se ve afectado por diferentes agentes causales de enfermedades, entre los cuales están el virus del síndrome de la hoja amarilla (ScYLV), detectado con altos niveles de incidencia y distribución comercial, en los ingenios Valdez y San Carlos.

Con el fin de contribuir con un mejor conocimiento epidemiológico de esta enfermedad, se establecieron cinco bioensayos, que consistieron en determinar cual era el vector, los tiempos óptimos de ayuno, acceso a la adquisición e inoculación y la preferencia del insecto vector hacia cinco variedades comerciales y ocho clones ECSP del CINCAE. Los bioensayos de transmisión se verificaron mediante la técnica "Tissue Blot Inmuno Assay TBIA".

Se comprobó bajo condiciones de invernadero, que el áfido blanco de la caña de azúcar *Melanaphis sacchari*, es un vector del ScYLV, mas no el saltahoja hawaiano *Perkinsiella saccharicida*. Se pudo determinar que para transmitir el ScYLV con *M. sacchari*, el periodo óptimo de ayuno del insecto era de 30 minutos, el de acceso a la adquisición de 48 horas y el de acceso a la inoculación de 30 minutos.

Se encontró mayor preferencia de *M. sacchari* a los clones ECSP98-169, ECSP98-127 y en la variedad PR 67-1070, con un promedio de 108.3, 96.38 y 101.58 áfidos por planta, comparados con los demás materiales. Por otro lado se presentó un bajo número de individuos en la variedad CR 74-250 y el clon ECSP98-149 con un promedio de 0.13 y 4.63 áfidos por planta respectivamente.

SUMMARY

In Ecuador, the sugarcane crop is affected by different causal agents of diseases, among of them, there is the sugar cane yellow leaf virus (ScYLV) detected with high levels of incidence and commercial distribution, in the Valdez and San Carlos sugar mill.

With the purpose of contributing with a better epidemic knowledge of this disease, five bioassay were settled down in to determine the vector, the good time of unfed, access to the acquisition and inoculation, and the preference of the vector insect toward five commercial varieties and eight ECSP clones of the CINCAE. The bioassay of transmission was verified by the "Tissue Blot Immuno Assay TBIA" technique.

As the results under greenhouse conditions was proven that the white aphid of the cane of sugar, *Melanaphis sacchari*, is a vector of the ScYLV, but not the sugarcane plant hopper, *Perkinsiella saccharicida*. The good period of unfed to transmit the ScYLV with *M. sacchari* was 30 minutes, and the access of the acquisition was 48 hours and access of the inoculation was 30 minutes.

The *M. sacchari* had bigger preference to the clones ECSP98-169, ECSP98-127 and the PR 67-1070 variety, with an average of 108.8, 96.38 and 101.58 aphid per plant, compared with the other materials. On the other hand, the CR 74-250 variety and the ECSP98-149 clone presented a low number of aphids with an average of 0.13 and 4.63 per plant respectively.

LISTA DE CUADROS

		Página
Cuadro 1.	Periodos de acceso a la transmisión evaluada en tres bioensayos (Hrs).	23
Cuadro 2.	Matriz de decisión para metodologías de establecimiento y mantenimiento de colonias de <i>M. sacchari</i> .	25
Cuadro 3.	Transmisión del virus ScYLV por <i>M. sacchari</i> y <i>P. saccharicida</i> (ANDEVA).	28
Cuadro 4.	Transmisión del virus ScYLV con <i>M. sacchari</i> y <i>P. saccharicida</i> (Comparación de medias)	28
Cuadro 5.	Periodos de ayuno de <i>M. sacchari</i> en la transmisión del virus ScYLV (ANDEVA).	29
Cuadro 6.	Periodos de ayuno de <i>M. sacchari</i> en transmisión del virus ScYLV (Comparación de medias).	29
Cuadro 7.	Periodos de acceso a la adquisición por <i>M. sacchari</i> en la transmisión del virus ScYLV (ANDEVA).	30
Cuadro 8.	Periodos de acceso a la adquisición por <i>M. sacchari</i> en la transmisión del virus ScYLV (Comparación de medias).	31
Cuadro 9.	Periodos de acceso a la inoculación por <i>M. sacchari</i> en la transmisión del virus ScYLV (ANDEVA).	31
Cuadro 10.	Periodos de acceso a la inoculación por <i>M. sacchari</i> en la transmisión del virus ScYLV (Comparación de medias).	32
Cuadro 11.	Preferencia de <i>M. sacchari</i> a variedades y clones promisorios de caña de azúcar (ANDEVA).	32
Cuadro 12.	Preferencia de <i>M. sacchari</i> a variedades y clones promisorios de caña de azúcar (Comparación de medias).	33
Cuadro 4A.	Resultado de diagnóstico de la verificación en transmisión de ScYLV por <i>M. sacchari</i> y <i>P. saccharicida</i> (3, 4, 5 y 6 meses después de la transmisión).	Anexo
Cuadro 6A.	Transmisión del ScYLV con diferentes periodos de ayuno de <i>M. sacchari</i> (3, 4 y 5 meses después de la transmisión).	Anexo
Cuadro 8A.	Transmisión del ScYLV con diferentes periodos de adquisición del virus con <i>M. sacchari</i> (3, 4 y 5 meses después de la transmisión).	Anexo
Cuadro 10A.	Transmisión del ScYLV con diferentes periodos de inoculación del virus con <i>M. sacchari</i> (3, 4 y 5 meses después de la transmisión).	Anexo

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Metodologías evaluadas de establecimiento y mantenimiento de las colonias de <i>M. sacchari</i> . a. trozo pequeño de hoja en caja petri, b. trozo de hoja sobre esponja orgánica en caja entomológica, c. planta cubierta con botella plástica grande, d. Trozo pequeño de hoja sobre esponja cubierto con botella plástica pequeña.	13
Figura 2.	Caja entomológica empleada para el establecimiento y mantenimiento de la colonia de <i>P. saccharicida</i> .	14
Figura 3.	Impresión de la nervadura de la hoja de caña de azúcar en una membrana de nitrocelulosa, para el diagnóstico inmunológico del ScYLV.	14
Figura 4.	Macerado del tejido foliar en un mortero para semipurificar el virus ScYLV para el diagnóstico por DBIA.	15
Figura 5.	Material vegetativo sembrado sobre: sustrato de ceniza + cachaza, en bandejas plásticas (izq) y Vasos de plumafon-icopor (der).	16
Figura 6.	Adultos de <i>P. saccharicida</i> , alimentándose en plántulas infectadas con el ScYLV.	17
Figura 7.	Colocación de <i>M. sacchari</i> virulífero en plántulas sanas (A). Cilindros entomológicos en los cuales se evito contaminación en las pruebas de transmisión del ScYLV, con <i>P. Saccharicida</i> (izq) y <i>M. Sacchari</i> (der.), en plántulas de la variedad Ragnar (B).	17
Figura 8.	Etapas evaluadas en el proceso de transmisión del ScYLV por <i>M. sacchari</i> .	20
Figura 9.	Cajas entomológicas en las cuales se realizó la prueba de preferencia de <i>M. sacchari</i> hacia las plantas de caña de azúcar de <i>M. sacchari</i> .	19
Figura 10.	Colonia de <i>M. sacchari</i> establecida bajo condiciones de invernadero (izq) y adulto (der).	26
Figura 11.	Adultos de <i>P. saccharicida</i> establecidos bajo condiciones de invernadero.	26
Figura 12.	Reacción de precipitación en los diagnósticos inmunoenzimático DBIA (izq) y TBIA (der) para la detección de ScYLV.	27
Figura 13.	Crecimiento de las colonias de <i>M. sacchari</i> , en el tiempo (CINCAE).	Anexo

1. INTRODUCCIÓN

El azúcar uno de los principales elementos de la canasta básica alimenticia de nuestro país, es uno de los productos finales del cultivo de la caña de azúcares, el que ocupa una importante participación en la economía ecuatoriana, con su contribución al PIB nacional del 1.4 % y con relación al PIB agrícola del 12%. Originando en época de zafra (cosecha) 30.000 empleos directos y 80.000 indirectos (SICA, 2004).

El área cultivada de esta gramínea en Ecuador es de 125.355 has. de acuerdo con el último censo agropecuario año 2000, con 82.749 has. destinadas a la producción de azúcar y 42.606 destinadas para otros usos (INEC, 2004). Del total del área sembrada para la producción de azúcar, la mayoría se encuentra sembrada con una sola variedad, conocida como Ragnar, con lo que existe actualmente un problema epidemiológico, debido a la presencia de una nueva enfermedad denominada hoja amarilla la cual es causada por un virus denominado el virus de la hoja amarilla Suagarcane Yellow Leaf Virus (SCYLV).

El incremento de la enfermedad de la hoja amarilla en semilleros de la variedad Ragnar de los ingenios azucareros, de acuerdo a comparación de los diagnósticos realizados entre el año 2001 a 2004, a sido alto, pasando la incidencia de 17.7 a 28.2 por ciento en el ingenio San Carlos, mientras que en el ingenio Valdez pasó de 1.2 a 11.6 por ciento y en el ingenio la Troncal de 0 a 5.6 por ciento (Garcés, 2003), detectándose altos niveles de incidencia y distribución en cultivos comerciales sembrados con las variedades, Ragnar, CR 74132, PR 671070, B 7678, entre otras, especialmente en dos de los tres ingenios más importantes, Valdez y San Carlos. En nuestro medio se desconoce el vector del virus, que en el campo está diseminando la enfermedad y las interacciones que tiene con el virus y la caña de azúcar.

En las áreas de producción del cultivo de la caña de azúcar del litoral ecuatoriano, esta el áfido vector de la caña de azúcar *Melanaphis sacchari* reportado como vector del virus en otras zonas ecológicas. Además tenemos otro insecto chupador con altas poblaciones denominado pulgón hoja Hawaiano, *Perkinsiella saccharicida*, del cual existe preocupación que pueda también estar involucrado en la diseminación de la enfermedad.

En la zona tropical las altas temperaturas a diferencia de las zonas subtropical, aceleran la tasa de multiplicación y con esto las poblaciones de los insectos vectores, por lo que se esperaría

una mayor diseminación de la enfermedad, esto depende del tipo de transmisión que tenga el virus, y de ello el control que se puede dar a la enfermedad por medio de variedades, evitando la aplicación de insecticidas, los cuales causarían un impacto económico y ambiental en el agroecosistema de la caña de azúcar.

Para tener un mejor conocimiento de la epidemiología del virus del síndrome de la hoja amarilla (ScYLV), es importante conocer bajo nuestras condiciones la relación o interacción que existe con su vector y huésped, por lo que fue necesario establecer una metodología que nos permita transmitir y detectar la presencia del virus en las plantas de caña de azúcar, delineando los siguientes objetivos:

1.1. Objetivos

1.1.1. General

- Contribuir al mejor conocimiento epidemiológico del virus de la hoja amarilla (ScYLV) en caña de azúcar.

1.1.2. Especifico

- Determinar la capacidad de transmisión del virus de la hoja amarilla por *M. sacchari* y *P. saccharicida*.
- Desarrollar una metodología que permita transmitir SCYLV.
- Determinar el grado de preferencia del vector hacia cinco variedades comerciales y ocho clones ECSP del CINCAE.

1.2. Hipótesis

- El insecto *M. sacchari* es un vector del virus de la hoja amarilla (ScYLV).
- *P. saccharicida* es vector del virus causante de la hoja amarilla.
- Existen diferentes grados de preferencia del insecto vector hacia variedades de caña de azúcar.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Sintomatología de la enfermedad

De acuerdo con Comstock *et al.* (1999) en el año de 1994, la sintomatología del problema fue registrada como enfermedad. El Síndrome de la hoja amarilla YLS (Yellow leaf syndrome) se describe como un desorden en el crecimiento de la planta, se caracteriza por una serie de síntomas, que incluyen amarillamiento especialmente en el envés de la nervadura y en la lámina foliar de las hojas 3 a 5 (Lockhart, 2000).

Además, se presenta amarillamiento y necrosis desde el ápice de la hoja, expansión gradual del amarillamiento desde la nervadura hacia los bordes, acortamiento de entrenudos terminales, acumulación de pigmentos de antocianina en las hojas, bloqueo en la translocación de azúcar desde las hojas hacia los tallos y acumulación de azúcar en la nervadura de la hoja (Comstock *et al.*, 1999; Lockhart, 2000).

En algunas variedades se puede observar una decoloración rojiza sobre el haz de las nervaduras las cuales a la vez presentan los síntomas de amarillamiento en el envés. En general, el síndrome se acentúa hacia la madurez de la caña (Comstock *et al.*, 1999); aunque, desde los siete meses se pueden observar los síntomas (Garcés, 2001).

2.2. Importancia de la enfermedad

2.2.1. Distribución e incidencia

El Síndrome de la hoja amarilla (YLS) fue registrado por primera vez por Ricaud (1968), citado por Garcés y Valladares (2001), quien describe en plantaciones de caña de azúcar *Saccharum officinarum* del oriente de África en 1960, un desorden caracterizado por un amarillamiento pronunciado del limbo de la hoja y acompañado en algunas ocasiones por acortamiento de entrenudos terminales.

Este desorden fue referenciado como marchitamiento amarillo y después como síndrome de la hoja amarilla (ScYLV). Esta enfermedad fue registrada en 1994 en Hawái, Estados Unidos (Victoria, *et al.*, 1998). Luego fue mencionado en numerosas áreas productoras de caña y sus síntomas fueron asociados con descensos en el rendimiento y en la productividad de los cultivos de caña de azúcar (Lima *et al.*, 1995; Vega *et al.*, 1997).

En el Ecuador se confirmó la presencia del virus causante del síndrome de la hoja amarilla, en el año 2001, mediante la técnica del tissue - Blot assay (TBIA), utilizando un antisuero específico para el patógeno. Se detectó en semilleros de caña de azúcar de los principales ingenios del litoral ecuatoriano; con una incidencia promedio de 35 % (Garcés y Valladares, 2001).

De acuerdo con Garcés (2003), el virus del síndrome de la hoja amarilla (ScYLV) se detectó en canteros comerciales de los ingenios San Carlos, Valdez y la Troncal, con incidencias del 44.78, 16.9 y 1.08% respectivamente, con un promedio del 26.32%, detectándose en el 73.82% de los canteros evaluados. Los mayores niveles de infección se detectaron en variedades de reciente introducción como la CR 74-250, PR 67-1070, B 76-78. La enfermedad se detectó en 54% de los clones y en 26 de los 30 cruzamientos preseleccionados del Estado II 2000 del CINCAE (Garcés y Valladares, 2001).

2.2.2. Efecto en la producción

En Sudáfrica y Hawaii, el YLS incrementó los complejos de polisacáridos (gomas), los cuales interfieren en el proceso de la extracción de azúcar (Lockhart y Crongé, 2000). De acuerdo con Lockhart, *et al.* (1995) en Brasil, los efectos en la producción fueron cuantiosos, especialmente en variedades susceptibles como SP 71-6163, en la cual presentó disminución entre el 60 y el 80 por ciento.

De acuerdo con Victoria, *et al.* (2000) la producción de las variedades CC 84-75 y CC 85-96, disminuyó en 1,2 y 0,32 ton/ha respectivamente, por cada 1% de infección.

2.3. Agente causal

La enfermedad, presenta dos formas biológicas, la primera se la asocia con el virus, generalmente en el hemisferio occidental, recibiendo el nombre de Sugarcane yellow leaf virus (ScYLV) según Lockhart, *et al.*, 1996; confirmado más tarde por Vega *et al.* (1997) y el mismo Lockhart (2000) y la segunda con un fitoplasma, denominándose Sugarcane yellow phytoplasma (ScYP), de acuerdo con Crongé *et al.*, (1998) quien observó mediante microscopía electrónica en el floema de variedades surafricanas con síntomas de amarillamiento y más tarde confirmó su presencia mediante pruebas moleculares utilizando la reacción en cadena de polimerasa (PCR).

2.3.1. Clasificación

Moonan y Mirkov (2001) mediante el análisis de secuencias utilizando técnicas moleculares a partir de los diferentes aislamientos y la asociación con otros virus relacionados con la familia Luteoviridae, determinaron que el virus del síndrome de la hoja amarilla es un Polerovirus.

2.3.2. Características

El virus del síndrome de la hoja amarilla considerado un Polerovirus de la familia Luteoviridae, tiene un genoma RNA de una sola banda de 5 – 8 Kb (Schenk *et al.*, 2000); la proteína de la capsida tiene una masa molecular relativa de 27 KDa y no es glicosilada (Mansur y Lockhart, 2000), es degradado por RNasas, pero no por DNasas y está confinado al floema de la planta (Schenck *et al.*, 2000).

Las partículas virales fueron reconocidas por Vega *et al.* (1997) por su forma circular, las que tenían un diámetro de 22 a 24 nm., lo que después fue ratificado por Scagliusi y Lockhart (2000) pero con un diámetro de 25 a 29 nm.

De acuerdo con los análisis de diversidad de genotipos realizados por Smith *et al.* (2000) señalan que el genoma del virus del síndrome de la hoja amarilla raza florida (ScYLV-F) es de 8095 pares de bases, que incluye seis marcos de lectura abierta (ORF), de los cuales los dos primeros están muy relacionados con el grupo de los polerovirus, el tres y cuatro con los luteovirus y el quinto con enamovirus, indicando que estas diferencias en la afinidad se debe a la recombinación genética.

2.3.3. Razas

Moonan y Mirkov (2001) mencionan que el virus del síndrome de la hoja amarilla tiene tres razas definidas como Florida/Texas (F/T), Brasil (B) y un posible nuevo grupo de origen colombiano.

Más tarde, Ángel, *et al.* (2001) confirmó la presencia de las razas del síndrome de la hoja amarilla, razas F/T, B y una posible mezcla de las dos razas. Trabajos recientes, señalan la presencia de un tercer grupo divergente del virus en Colombia, afectando especialmente la variedad CC 85-96 según, Moonan *et al.* (2000) citado por Ángel, *et al.* (2001).

2.4. Diagnóstico

Para determinar que una enfermedad es causada por ciertos virus requiere de tiempo, conocimiento y trabajos complementarios; entre ellos la observación de síntomas, sin embargo esto se puede confundir con deficiencias o toxicidad de nutrientes, secreciones de insectos u otros factores o patógenos (Agrios, 1996), por ello la necesidad de contar con una herramienta confiable y veras para la determinación de la causa posible de la enfermedad.

De acuerdo con Velasco (2004) quien relata una historia de los métodos de diagnóstico de virus que afectan a las plantas, desde el año 1966 donde Avrameas y Uriel concibieron la idea de la técnica inmunoenzimática, al marcar antígenos y anticuerpos con enzimas para utilizarlos en pruebas de inmunodifusión doble. Fueron Engvall y Perlmann (1971 – 1972) citados por Velasco (2004) quienes describieron el denominado método ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) para titular inmunoglobulinas. El mismo autor, menciona que en 1976 publicaron el primer estudio de aplicación de ELISA, en su variante de “emparedado de anticuerpos” para la detección de dos virus de vegetales.

En la actualidad se puede diagnosticar el virus ScYLV con: ELISA (Enzyme Linkeked Immunosorbent Assay), TBIA (Tissue Blot Inmuno Assay), DBIA (Dot Blot Inmuno Assay), RT-PCR (Transcription Reverse Polymerase Chain Reaction) y microscopia electrónica (Shenck *et al.*, 1997, Victoria *et al.*, 1998, Moonan y Mirkov, 1999, Scagliusi y Lockhart, 2000, Avellaneda *et al.*, 2003).

En Ecuador Garcés y Valladares (2001) para el diagnóstico del ScYLV utilizaron la metodología desarrollada por Shenck *et al.*, (1997) y modificada por Guzmán y Victoria (2000) y Lebrer (2001). La técnica de diagnóstico TBIA consiste, en realizar la impresión de la superficie de la hoja, en una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm (BIO RAD). Para luego realizar una prueba que consiste en incubar la membrana con diferentes soluciones (antisueros), para finalmente visualizar indirectamente la presencia/ausencia de la proteína viral, mediante una reacción de color, esta visualización puede ser a simple vista o con la ayuda de un microscopio.

2.5. Transmisión del virus

2.5.1. Mecanismos de transmisión

Los virus que infectan a las plantas provocan una gama de reacción en su hospedante pero casi nunca abandonan espontáneamente (viento o agua) para infectar otra, a menos que entren en contacto con los contenidos de una célula viva afectada (Agrios, 1996).

De acuerdo, con Bedendo (1995) existen diferentes formas en las que se diseminen los virus como es la propagación vegetativa, mecánicamente a través de la savia, semilla, polen, insectos, ácaros, nematodos, la cuscuta y hongos.

2.5.2. Transmisión por vectores

Uno de los métodos más eficientes del cual se vale la naturaleza para propagar los virus es con la ayuda de ciertos animales, en especial los insectos, denominados vectores (Sánchez *et al.*, 2000). La interacción virus - vector - planta es extremadamente compleja ya que cada uno de estos se caracterizan de acuerdo al medio donde viven, a la especie vegetativa, a la raza del virus y a la relación intrínca del virus con su vector.

La transmisión de los virus más comunes y económicamente más importante en el campo lo constituyen los insectos vectores, de acuerdo a una estimación realizada por Bustillo y Sánchez (1977) donde mencionan que los insectos transmiten entre el 80 y 90% de las virosis vegetales, de los cuales destacan a los pulgones o áfidos como el grupo más numeroso y eficiente.

La relación que existe entre el vector y los virus, en cuanto a los periodos de adquisición, de inoculación y de retención de la partícula viral por parte del vector permite clasificarlos en: virus no persistentes, semipersistentes y persistentes o circulativos (Sánchez *et al.*, 2000, Bedendo, 1995, Bostrom, 1998).

Los virus transmitidos de manera no persistentes están presentes en tejidos superficiales de la planta, mientras que los virus transmitidos persistentemente están localizados siempre en tejidos especializados como el floema. Los semipersistentes, tales como el enanismo del maíz, tiene propiedades intermedias de transmisión del virus, persistentes y no persistentes de acuerdo con Bedendo (1991) citado por Satapaty (1998). Estos virus (Polerovirus) no se replican en su vector, pero este tiene la habilidad de retener la partícula y transmitirlo en pocos días (Satapaty, 1998).

Los vectores de los Luteovirus en especial el de ScYLV parecen ser específico, ya que la partícula viral puede ser transmitida por uno o varias especies de áfidos (Molinero y Rasochova, 1997) citado por Schenck, S. (2001), esta especificidad está determinada por las glándulas salivales adicionales al lema y membranas del plasmalema basal donde es reconocida la partícula viral (Schenck, 2001).

2.5.3. Transmisión del virus en caña de azúcar

El virus del síndrome de la hoja amarilla (ScYLV), es transmitido de manera semi-persistente por el áfido blanco de caña de azúcar *Melanaphis sacchari*, *Rhopalusiphum maidis* del maíz y por los *restabdominales* del arroz y no es transmitido mecánicamente (Scagliusi y Lockhart, 2000; Schenck, 2000).

Scagliusi y Lockhart (2000) registraron la transmisión del ScYLV por medio de los insectos vectores *M. sacchari* y *R. maidis*, con un periodo de acceso a la adquisición de 48 a 72 horas, además indican que observaron los primeros síntomas de la enfermedad, aunque no uniformes, a la sexta semana después de la inoculación, y luego los segundos síntomas entre los 8 y 10 meses, esporádicamente.

De acuerdo con, Avellaneda *et. al.* (2003) los áfidos adquirieron el virus en un periodo mínimo de 48 horas de alimentación en plantas infectadas, empleando grupos de 20 individuos por planta.

2.4. Descripción de los vectores

Los insectos son importantes por el efecto que causa cada uno de ellos; en la caña de azúcar, se han identificado alrededor de 1300 especies, de acuerdo con Box (1953) citado por Rao y Ford (2000), de los cuales han sido reportados 48 insectos y 2 hongos como transmisores de virus y plasmogamas bajo condición natural y experimental (Rao y Ford, 2000).

2.6.1. Descripción y bioecología del áfido blanco de la caña de azúcar

Este insecto está clasificado taxonómicamente en el Orden: Homóptera, Familia: Aphididae, Género: *Melanaphis* y Especie: *sacchari* (Zehntner), sus sinónimos son: *Aphis sacchari* y *Homogiguis sacchari* (Zehntner), de acuerdo a lo descrito por Bustillos y Sánchez (s/f).

El áfido blanco de la caña de azúcar, *Melanaphis sacchari*, tiene un cuerpo de color amarillo grisáceo y se lo encuentra en dos formas, ápteros (sin alas) y alados, los ápteros con antenas son de 5 segmentos, alcanzando un poco más de la longitud de su cuerpo que llega a medir 1,5 mm, la cauda oscura notoriamente contraída ligeramente más larga que los cornículos, con aproximadamente 4 pelos en cada lado (Mendoza, 2003; Bustillos y Sánchez, s/f).

Los alados, tienen cabeza y tórax de color negro, cuatro segmento antenal es con pocas o ninguna sensoria, el tercer segmento con cerca de 7 sensorias, setas sobre el abdomen prominentes, cauda casi cónica, con cinco pares de pelos (Bustillos y Sánchez, s/f).

Los áfidos presentan un ciclo de vida poco común y muy complejo, en el trópico la reproducción es permanente y no se producen machos, ni las hembras ponen huevos. Las generaciones son partenogénéticas, es decir las poblaciones que se originan por este sistema son asexuales, la dispersión ocurre cuando por carencia de alimento o aglomeración de colonias se producen las formas haladas (Bustillo, 1988).

Las mayores poblaciones de *M. sacchari*, se presentan en época seca y en variedades susceptibles, son parasitados exitosamente por la avispa *Lysiplebus testaceipes* y predadas por larvas y adultos de coccinélidos, sirfidos y crisopas (Mendoza, 2003).

2.6.2. Descripción y bioecología del saltahojas hawaiano

Este es clasificado taxonómicamente en el Orden: Homóptera, Familia: Delphacidae, Genero: *Perkinsiella* y Especie: *saccharicida* (Kirkaldy)

Mendoza (2003), indica que los adultos de *P. saccharicida* son pequeñas chicharritas que miden entre 1 mm de largo, son de color marrón claro, generalmente son macropteros (alados) aunque hay un pequeño porcentaje de hembras braquiptera (sin alas), las hembras alcanzan a ovipositar un poco más de 100 huevos, en grupos de 3 a 6, generalmente lo hacen en la nervadura central de la hoja.

El ciclo de vida de *Perkinsiella saccharicida*, toma cerca de 30 – 35 días, desde huevo a adulto, el periodo de incubación dura en promedio 11 días, con variación de 9 a 13 días; con un periodo de vida comprendidos por cinco instares que duran de 4 – 7 días cada uno, estas ninfas son

gregarias, permanecen agrupadas en la cara inferior de las hojas y en las vainas que están adheridas al tallo (Mendoza *et. al.*, 2001).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización

El presente ensayo de investigación se desarrolló en invernadero y laboratorio de las áreas de Fitopatología y Entomología de la estación experimental del Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador (CINCAE).

El CINCAE, se encuentra ubicado en el kilómetro 49,5 de la vía Durán – Tambo, en el cantón Triunfo, provincia del Guayas, a 02° 19' 33" de Latitud Sur y 79° 26' 83" de Longitud Oeste, con una temperatura promedio anual de 25 °C, precipitación media anual de 1202,2 mm, y Humedad Relativa del 80,1% a 60 m.s.n.m.*

3.2. Materiales

Entre los principales materiales, reactivos y equipos, que se utilizaron en el presente trabajo investigativo, se citan los siguientes:

Materiales de laboratorio y campo: fiola, probeta, puntas, pipetas, microtubos, piedra magnética, espátula, papel aluminio, papel toalla, cinta de papel, fundas de polietileno, etiquetas de identificación, pinzas, vasos icopor, macetas, fundas, hielera, cajas petri de todo tamaño, tubo de ensayo, algodón, papel filtro, estilete, jaula entomológica, esponja orgánica, bandeja, sustrato (suelo, cachaza, arena y ceniza) cuchillo, marcadores permanentes, trampas de cebada, libreta de registro.

Reactivos: membrana de nitrocelulosa, cloroformo, Tris-base, Tris-hcl, albúmina de suero bovino, leche seca descremada, antisuero específico para el virus en estudio, conjugado, PBSA, cloruro de sodio, cloruro de magnesio, NBT, BCIP, cloro y amonio cuaternario (desinfectante).

Equipos: Estéreo microscopio, Equipo Dot-blot Bio-Rat, micro centrifuga, agitador magnético, agitador horizontal, potenciómetro, balanza analítica, saca yemas, machete, termómetro, pilón, motor y vehículo.

*Código del CINCAE.

3.3. Establecimiento y mantenimiento de colonias

3.3.1. Áfido blanco de la caña de azúcar *M. sacchari*.

Se recortaron trozos de hojas que contenían colonias del áfido blanco, *Melanaphis sacchari* de los diferentes lotes del campo experimental del CINCAE, posteriormente se llevaron a condiciones de invernadero del mismo centro, donde se eliminaban los insectos parasitados, muertos o material extraño presente en la colonia colectada, con la finalidad de obtener ejemplares sanos y vigorosos para luego establecerlos.

Para el establecimiento y mantenimiento se evaluaron varias metodologías, entre las más importantes constan:

- En pequeños trozos de hoja y estos dentro de una caja petri con una perforación en la tapa (Fig. 1.a),
- Trozo de hoja sobre esponja orgánica y esta dentro de una jaula entomológica (Fig. 1.b),
- En plantas pequeñas, sobre esponja orgánica húmeda cubierta totalmente con un botella plástica con una perforación en la parte superior (Fig. 1.c),
- En trozos de hojas, en esponja orgánica húmeda y aislados, con una botella plástica 250 cc. Con una perforación en la parte superior (Fig. 1.d).

Para escoger la metodología que se utilizó en el mantenimiento de las colonias del áfido blanco de *sacchari*, se recurrió a una matriz de decisión elaborada de acuerdo a las necesidades del presente trabajo. Se contrastó las metodologías con las características tomadas para la decisión (anexo 2), las cuales fueron calificadas de 1 a 5, donde uno era muy malo y cinco muy bueno, al final se sumó para seleccionar la metodología de mayor puntaje.

3.3.2. Saltahojas hawaiano, *Perkinsiella saccharicida*

Para establecer la cría de *P. saccharicida* bajo condiciones de invernadero, al inicio se recolectaron manualmente los insectos, desde un cantero infestado, localizado en el ingenio San Carlos, sector El Paraíso, con la ayuda de un embudo plástico para luego depositarlas en varias jaulas entomológicas debidamente confeccionadas y equipadas, de acuerdo a la metodología establecida en el departamento de entomología del CINCAE.

La cría de *P. saccharicida*, partió de las posturas de varios adultos capturados, se colocaron en diferentes jaulas entomológicas 40x40x60 cm. debidamente confeccionadas de acuerdo a la edad de las posturas (Fig. 2).

El mantenimiento de los diferentes individuos (ninfas y adultos) de *M. sacchari* y *P. saccharicida*, se realizó mediante la renovación oportuna de los trozos de hojas las cuales fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 0.3% por 5 minutos y luego tres lavados con agua limpia.



a



b



c



d

Figura 1. Metodologías evaluadas de establecimiento y mantenimiento de las colonias de *M. sacchari*. a. trozo pequeño de hoja en caja petri, b. trozo de hoja sobre esponja orgánica en caja entomológica, c. planta cubierta con botella plástica grande, d. Trozo pequeño de hoja sobre esponja cubierto con botella plástica pequeña.



Figura 2. Caja entomológica empleada para el establecimiento y mantenimiento de la colonia de *P. saccharicida*.

3.4. Técnicas inmunoenzimáticas para detectar el ScYLV

3.4.1. Técnica de diagnóstico Tissue – Blot inmuno assay (TBIA)

Esta metodología consiste en realizar la impresión de la nervadura de la hoja, en una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm BIO-RAD (Fig. 3).



Figura 3. Impresión de la nervadura de la hoja de caña de azúcar en una membrana de nitrocelulosa, para el diagnóstico inmunológico del ScYLV.

Realizada la impresión, se efectuó el bloqueo de la membrana en Tris buffer TBS pH 7.5, adicionando leche seca descremada de BIO-RAD (1%) y albúmina de suero bovino libre de globulinas, y se dejó en agitación horizontal. Luego se realizó tres enjuagues con TBS pH 7.5, después de transcurrido el tiempo de bloqueo, se realizaron dos lavados rápidos con TBS pH 7.5 y luego se incubó en agitación con el antisuero policlonal específico para el virus.

Después de tres lavados con TBS pH 7.5, se encubó en agitación la membrana en inmunoglobulina anti-Rabbit preparada en cabras y conjugada con fosfatada alcalina de marca BIO-RAD. Se mantuvo en agitación con TBS pH 7.5, adicionando leche seca descremada de BIO-RAD (1%).

Finalmente para visualizar la presencia/ausencia de la proteína viral, se observó una reacción de precipitación de color púrpura a nivel de la huella de las células del floema al incubar la membrana en buffer de sustrato pH: 9.5, adicionando NBT (nitro blue tetrazolium), BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolyl phosphato), NaCl y MgCl₂. una vez terminado el tiempo de incubación en el sustrato (20 min.), se obtuvo la reacción con dos enjuagues en agua destilada.

3.4.2. Establecimiento de técnica de diagnóstico Dot Blot Inmuno Assay (DBIA)

Se realizaron varias pruebas para el establecimiento de la técnica dot-blot con el fin de diagnosticar la presencia del virus del amarillamiento en plántulas a temprana edad. De acuerdo a la metodología desarrollada por Scaliusi y Lockhart (2000) y modificada por Guzmán y Herrera (2000).

La metodología consistió en cortar en trozos pequeños del tejido foliar, se maceró 100 mg. en un mortero agregando el buffer (Fig. 4), después se colocó la savia en microviales para ser centrifugada (12000 rpm por 2 min, a 4 °C.) y a partir del sobrenadante se realizó una dilución con TBS pH: 7.5 y DIECA para luego ser colocada en el equipo de Dot-blot, el cual contenía una membrana de nitrocelulosa (MNC : 0.45 u), se dejó por 6 horas a temperatura ambiente o a 4 °C. para luego realizar la prueba de acuerdo a lo explicado en el punto anterior.



Figura 4. Macerado del tejido foliar en un mortero para semipurificar el virus ScYLV para el diagnóstico por DBIA.

3.5. Obtención de plantas sanas y enfermas

Para los diferentes bioensayos de adquisición y transmisión del virus se utilizaron plantas de la variedad Ragnar infectadas por el ScYLV en donde los insectos adquirieron el virus y plantas sanas libres del virus de la misma variedad a las cuales se transmitió la enfermedad, para la obtención de éste material vegetativo se analizaron muestras de plantas de 7 meses de edad mediante el diagnóstico serológico Tissue-Blot inmunoassay (TBIA) colectadas en el CINCAE.

Con los resultados, se procedió a cortar la semilla sana y enferma debidamente identificada; al material sano se le practicó el tratamiento térmico corto de baño maría (51°C/30 min.), para de esta forma activar su germinación y eliminar patógenos, mientras que al enfermo no se le aplicó ningún tipo de tratamiento.

Se procedió a sembrarlas en bandejas plásticas (Fig. 5 izq.), previa inmersión en un fungicida preventivo, Vitavax (5%) por 5 minutos, se empleó como sustrato ceniza y cachaza zarandeada, las plantas permanecieron en sustrato por 15 días, luego se las transplantó a vasos de plumafon con sustrato de suelo y cachaza 1:1 (Fig. 5 der.), cuando alcanzaron un tamaño adecuado (15 días después) se las transplantó finalmente a fundas de polietileno 20 x 40 cm. sin disturbar el sustrato de tierra, quedando listas para los tratamientos. Todo este proceso se realizó bajo condiciones de invernadero.



Figura 5. Material vegetativo sembrado sobre sustrato de ceniza + cachaza, en bandejas plásticas (izq) y vasos de plumafon-icopor (der).

Después se realizó la siembra del material requerido para la prueba de preferencia, cortando y sembrando yemas como semillas de las variedades: Ragnar, B 76-78, PR 67-1070, CR 74-250, CR 76-42 y los 8 clones del estado IV 98 del programa de mejoramiento del CINCAE.

3.6. Bioensayo de transmisión del virus por *M. sacchari* y *P. saccharicida*

Una vez establecidas las colonias de los dos insectos, el áfido blanco *Melanaphis sacchari* y *Perkinsiella saccharicida*, se colocaron adultos en plantas infectadas naturalmente con ScYLV con la ayuda de un pincel húmedo + caja petri para los áfidos y un tubo de ensayo para los saltahojas, (Fig. 6), previo ayuno de 30 minutos para las dos clases de insectos. Se dejaron los insectos durante un tiempo de 48 horas para que estos se alimentaran y pudieran adquirir el virus, según lo descrito por Scagliusi y Lockhart (2000) y Avellaneda, *et al.* (2003). Una vez completo el tiempo de alimentación, con la ayuda de un pincel húmedo, un tubo de ensayo y caja petri, se trasladaron los insectos cuidadosamente a plantas sanas (Fig. 7 A)



Figura 6. Adultos de *P. saccharicida*, alimentándose en plántulas infectadas con el ScYLV.



Figura 7. Colocación de *M. sacchari* virulífero en plántulas sanas (A). Cilindros entomológicos en los cuales se evito contaminación en las pruebas de transmisión del ScYLV, con *P. saccharicida* (izq) y *M. Sacchari* (der.), en plántulas de la variedad Ragnar (B).

Se colocaron 20 especímenes de *M. sacchari* y 20 de *P. saccharicida* por plántula (20 repeticiones), dejándolos por un periodo de 48 horas (Scagliusi y Lockhart, 2000), protegidos con un cilindro entomológico por cada planta la cual fue tomada como unidad experimental (Fig. 7B), luego fueron eliminados con un insecticida (Malatión 2cc/l de agua).

La infección se verificó a los 3, 4, 5 y 6 meses después de realizada la prueba, mediante la técnica TBIA.

Una vez confirmada la inoculación y conociendo el vector de ScYLV, se trabajó en los diferentes bioensayos, los cuales se llevaron bajo condiciones de invernadero, detallados a continuación:

3.6.1. Periodo de Ayuno de *Melanaphis sacchari* previo a adquirir ScYLV

Se evaluaron cuatro periodos de ayuno de 0.05, 0.5, 1 y 1.5 horas, más el testigo absoluto, con 10 repeticiones cada uno. Consistió en mantener los áfidos en cajas petri selladas, con papel filtro en el fondo y con una perforación en la tapa para facilitar la respiración del insecto y evitar su muerte. Después de someter los insectos al ayuno en los tiempos antes mencionados, estos se depositaron sobre las plantas enfermas, donde se los mantuvo por 48 horas de acceso a la adquisición, cumplido este tiempo se los pasó a plantas sanas donde se los dejó por un lapso de tiempo de 48 horas de acceso a la inoculación, se les aplicó un insecticida para su eliminación (Fig. 8). La verificación de la transmisión se evaluó a los 3, 4 y 5 meses después de realizada la prueba, mediante la técnica TBIA.

3.6.2. Periodo de acceso a la adquisición del virus ScYLV por *Melanaphis sacchari*

Se evaluaron 7 tiempos diferentes de acceso a la adquisición del virus, desde las plantas enfermas, 0.05, 0.5, 1.5, 4.5, 12, 24 y 72 horas más el testigo absoluto, con 10 repeticiones cada uno. Consistió en dejar los insectos alimentándose o en acceso a la adquisición del virus en las plantas enfermas durante los tiempos antes mencionados, previo ayuno de 30 minutos; transcurrido este tiempo los insectos se trasladaron a las plantas sanas, donde se los dejó por 48 horas y luego se les aplicó un insecticida para detener la alimentación (Fig. 8). La infección fue verificada a los 3, 4 y 5 meses después de realizada la prueba, mediante la técnica TBIA.

3.6.3. Periodo de Acceso a la Inoculación del virus ScYLV por *Melanaphis sacchari*

Se evaluaron 4 periodos 0.05, 0.5, 1.5 y 4.5 horas, de acceso a la inoculación del virus, la cual consistió en la alimentación de los insectos virulíferos, en plantas sanas, inicialmente los insectos se dejaron por 30 minutos de ayuno para luego dejarlos alimentando en plantas afectadas con el virus durante 48 horas. Después se los traslado a las plantas sanas donde se los dejó durante los tiempos antes mencionados, al final de cada periodo se le aplicó un insecticida (Fig. 8). La infección se verificó a los 3, 4 y 5 meses después de realizada la prueba, mediante la técnica TBIA.

3.7. Preferencia del vector

Esta prueba se la realizó con el objetivo de determinar la preferencia del áfido blanco de la caña de azúcar, *Melanaphis sacchari*, hacia 5 variedades comerciales, y 8 clones del estado IV serie 1998 del programa de mejoramiento del CINCAE, de acuerdo a su capacidad de establecimiento y multiplicación. La prueba consistió, en colocar en cada una de las plantas; 3 áfidos maduras, con la ayuda de un pincel húmedo, las cuales se mantuvieron en cajas entomológicas bajo condiciones de invernadero, estableciendo 10 repeticiones (Fig. 9). Se contabilizó el total de insectos establecidas por planta para asociarlo con la preferencia. Se realizaron 4 evaluaciones cada 8 días después de colocados los insectos.



Figura 9. Cajas entomológicas en las cuales se realizó la prueba de preferencia de *M. sacchari* hacia las plantas de caña de azúcar.

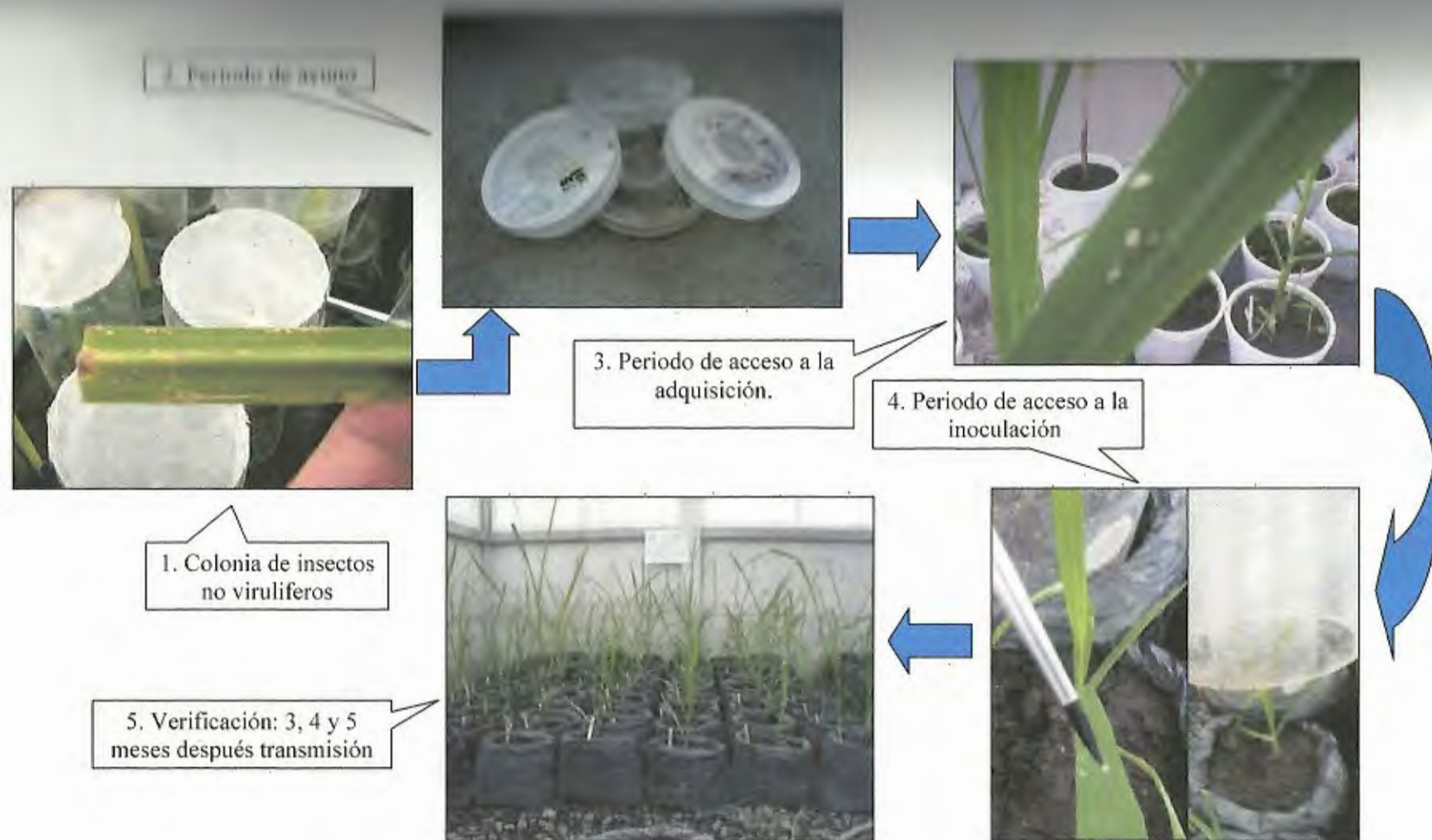


Figura 8. Etapas evaluadas en el proceso de transmisión del ScYLV por *M. sacchari*

3.8. Análisis estadístico

3.8.1. Bioensayos de transmisión de ScYLV

La primera prueba de transmisión por los insectos *M. sacchari* y *P. saccharicida*, se realizó bajo un diseño irrestrictamente al azar (DIA), teniendo como tratamientos a los dos insectos antes mencionados más el testigo y verificando el comportamiento, mediante diagnóstico en cuatro tiempos diferentes, cada tratamiento contó con 20 repeticiones para realizar la transmisión, tomando en cuenta cada planta como unidad experimental. Además se realizó la comparación de medias utilizando la prueba de Duncan al 0.05 de probabilidad.

Modelo matemático: $Y_{ijk} = \mu + T_i + E_{ij} + D_k + (TxE)_{ik} + E_{ijk}$

Donde:

- Y_{ijk} : La observación correspondiente al tratamiento i y tiempo j
- μ : Media general de la población
- T_i : Efecto del tratamiento (vectores)
- E_{ij} : Error experimental del tratamiento (efecto aleatorio) (a)
- D_k : Efecto de las evaluaciones en el tiempo sobre el tratamiento
- $(TxT)_{ik}$: Interacción del vector con el tiempo
- E_{ijk} : Error experimental del tratamiento en el tiempo (b)

ANDEVA

Fuente de Variación	Grados de Libertad	
Tratamientos	t-1	2
Error experimental (a)	t(r-1)	57
E (época de evaluación)	d-1	3
TxE	(t-1)(d-1)	6
Error experimental (b)	t(r-1)(d-1)	171
Total	trd-1	239

Las siguientes pruebas de ayuno, adquisición e inoculación, también se realizaron bajo un diseño irrestrictamente al azar (DIA), con 4 tratamientos (tiempos) para las pruebas de ayuno e inoculación y 7 tratamientos para la prueba de adquisición, incluido un testigo (Cuadro, 1). Se verificó el comportamiento en el tiempo, mediante diagnóstico en tres tiempos diferentes, tomando cada tratamiento con 10 repeticiones, teniendo en cuenta que cada planta se tomó

como unidad experimental. Además se realizó la comparación de medias utilizando la prueba de Duncan al 0.05 de probabilidad.

Modelo matemático: $Y_{ijk} = \mu + T_i + E_{ij} + D_k + (TxE)_{ik} + E_{ijk}$

Donde:

- Y_{ij} : La observación correspondiente al tratamiento i y tiempo j
- μ : Media general de la población
- T_i : Efecto del tratamiento (tiempos)
- E_{ij} : Error experimental de los tratamientos (efecto aleatorio) (a)
- D_k : Efecto de la evaluaciones en el tiempo sobre el tratamiento
- $(TxT)_{ik}$: Interacción del tratamiento con el tiempo
- E_{ijk} : Error experimental del tratamiento en el tiempo (b)

ANDEVA ENSAYOS DE AYUNO E INOCULACION

Fuente de Variación	Grados de Libertad	
Tratamientos	t-1	4
Error experimental (a)	t(r-1)	45
E (época de evaluación)	d-1	2
TxE	(t-1)(d-1)	8
Error experimental (b)	t(r-1)(d-1)	90
Total	trd-1	149

ANDEVA DE ADQUISICION

Fuente de Variación	Grados de Libertad	
Tratamientos	t-1	7
Error experimental (a)	t(r-1)	72
E (época de evaluación)	d-1	2
TxE	(t-1)(d-1)	14
Error experimental (b)	t(r-1)(d-1)	144
Total	trd-1	239

El análisis de varianza y comparación de media se realizó con los datos previa transformación por medio de $\sqrt{Y_i + 0.5}$ y con la ayuda del programa estadístico MSTAT-C.

Cuadro 1. Periodos de ayuno e incorporación de alimentos en el experimento.

Tratam. \ Bioensayo	Periodo de ayuno	Periodo de adaptación	Periodo de incorporación
Testigo	0	0	0
T ₁	0.05	0.05	0.05
T ₂	0.5	0.5	0.5
T ₃	1	1.5	1.5
T ₄	1.5	4.5	4.5
T ₅	-	24	-
T ₆	-	48	-
T ₇	-	72	-

3.3.2. Preferencia del insecto

El ensayo se realizó bajo un diseño de bloques al azar (DBA) con 13 tratamientos (Variedades) y 10 repeticiones, divididas en el tiempo para cada tratamiento, con un total de 130 unidades experimentales. Todos los datos previos al ANDEVA, fueron transformados a log. Base 10 y se realizó la comparación de medias utilizando la prueba de Tukey al 0.05 de probabilidad.

Modelo matemático: $Y_{ijk} = \mu + V_i + \beta_j + E_{ij} + T_k + (V \times T)_{ik} + E_{ijk}$

Donde:

- Y_{ij} : La observación correspondiente al tratamiento i y tiempo j
- μ : Media general de un tratamiento
- V_i : Tratamiento particular (variedad)
- β_j : Bloque
- E_{ij} : Error experimental del tratamiento
- T_k : Efecto del tiempo sobre el tratamiento
- $(V \times T)_{ik}$: Interacción de la preferencia del vector en el bloque en el tiempo
- E_{ijk} : Error experimental del tratamiento en el bloque en el tiempo

ANDEVA

Fuente de Variación	Grados de Libertad	
Variedades (tratamientos)	$v-1$	12
Bloque	$r-1$	9
Error experimental (a)	$(v-1)(r-1)$	108
T (tiempo de evaluación)	$t-1$	3
VxT	$(t-1)(v-1)$	36
Error experimental (b)	$v(r-1)(t-1)$	351
Total	$vrt-1$	519

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Capacidad de transmisión del virus de la hoja amarilla en caña de azúcar por *M. sacchari* y *P. Saccharicida*.

4.1.1. Establecimiento y mantenimiento de colonias

La matriz de decisión nos permitió definir la mejor metodología usada en el establecimiento y mantenimiento de colonias de áfido blanco, *Melanaphis sacchari*, la que consistía en tenerlos sobre trozos de hojas, en esponja orgánica húmeda y aislados, con una botella plástica con una perforación en la parte superior (Fig. 10). Esta metodología facilitó la manipulación de los insectos, un mejor establecimiento de las colonias con insectos de buen vigor aptos para la cría, es de bajo costo y permitió un control eficiente de parasitoides, tales como: *Lysiphlebus* (Hymenoptera: Braconidae) y de predadores (Cuadro 2) como los *Coccinélidos* (Coleóptero: Coccinellidae).

Cuadro 2. Matriz de decisión para metodologías de establecimiento y mantenimiento de colonias de *M. sacchari*.

METODOLOGÍA \ CARACT. DE DECISIÓN	Manipulación	Control de parasitismo	Crecimiento de colonia	Costo	Vigor de mat. Vegetativo	Total
Trozo de hoja dentro de una caja con una perforación en la tapa	1	5	2	3	1	12
Trozo de hoja sobre esponja orgánica y dentro de una jaula entomológica	5	2	5	3	2	17
Plántulas en vasos icopor y estos aislados con una botella plástica perforada en su parte superior	3	3	3	3	3	15
Trozo de hoja sobre esponja orgánica aislado con una botella plástica con una perforación en su parte superior	5	5	5	4	2	21

En los trabajos que se registra el establecimiento de las colonias de áfidos, normalmente lo realizan sobre plántulas, pero de acuerdo a lo observado, se presentaban problemas de parasitismo, el crecimiento de la colonia era lento y difícil manipulación de los insectos.

Las colonias de *Perkinsiella saccharicida* crecieron y se reprodujeron muy bien con la metodología establecida en el CINCAE. De lo observado se puede mencionar que en esta cría se tuvo la presencia de arañas que fueron controladas manualmente (Fig. 11).



Figura 10. Colonia de *M. sacchari* establecida bajo condiciones de invernadero (izq) y adulto (der).



Figura 11. Adultos de *P. saccharicida* establecidos bajo condiciones de invernadero

4.1.2. Selección de plantas sanas y enfermas para la transmisión

Mediante la técnica serológica "Tissue Blot Inmuno Assay TBIA", se realizó las evaluaciones de las muestras de hoja TVD (hoja con el último coello visible) de las plantas de variedad Ragnar, tomadas del lote 21 del CINCAE y de un semillero básico del ingenio Valdez, para conocer la presencia o no del virus del amarillamiento.

El ScYLV se detectó en el lote 21 del CINCAE, con un 75% de incidencia, mientras que en el semillero básico del ingenio fue mayor, alcanzando el 85,34%.

4.1.3. Establecimiento de la técnica de diagnóstico

Empleando la técnica denominada DBIA, los resultados de todas las pruebas no fueron favorables, ya que en las muestras se obtuvieron reacción inespecíficas, esta situación se presentó a pesar de realizar variaciones en la titulación del antisuero cedido por B.E.N. Lockhart y el producido por CENICANA, y la semipurificación de partículas virales (Fig. 12 izq.).

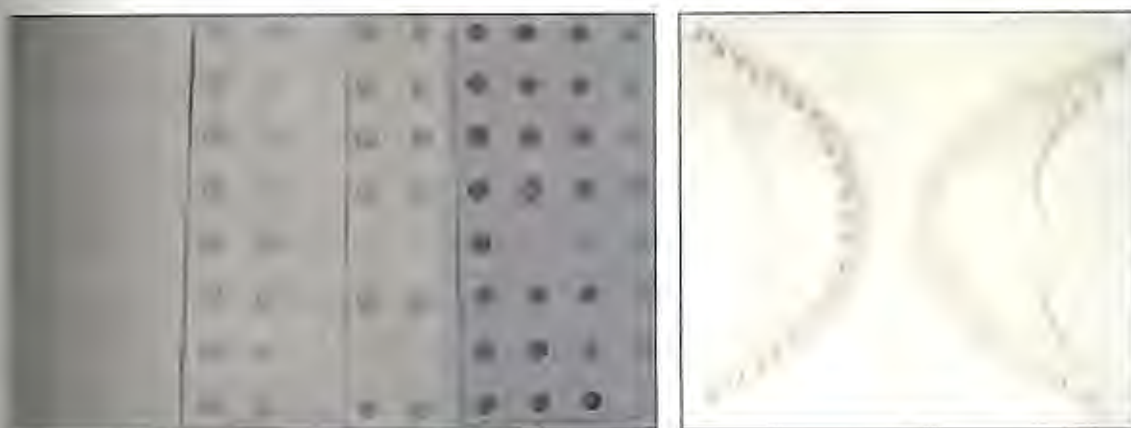


Figura 12. Reacción de precipitación en los diagnósticos inmunoenzimático DBIA (izq) y TBIA (der) para la detección de ScYLV.

Estas reacciones inespecíficas se pueden deber a la dificultad que se tiene con este virus en el proceso de su semipurificación; por ello la metodología más conveniente para verificar la transmisión del virus en el trabajo fue la técnica TBIA, empleada en el CINCAE para el diagnóstico rutinario de la enfermedad (Fig. 12 der.)

4.1.4. Ensayo de transmisión del virus por *M. sacchari* y *P. saccharicida*

Una vez realizado el diagnóstico del bioensayo de transmisión del virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar, teniendo como tratamientos al áfido blanco, *Melanaphis sacchari* y el saltahoja argentino, *Perkinsiella saccharicida*, a los 3, 4, 5 y 6 meses después del acceso a la inoculación, se encontró diferencia significativa entre los tratamientos (Cuadro 3).

De acuerdo a la comparación de medias de tratamientos (Duncan <0.05) se encontró que el insecto *M. sacchari* transmitió el virus en 7.5/20 plantas inoculadas, mientras que con *P. saccharicida* el resultado fue 0/20, observando diferencia altamente significativa entre los dos insectos (Cuadro 4).

Cuadro 3. Transmisión del virus ScYLV por *M. sacchari* y *P. saccharicida* (ANDEVA)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F - Calculada	Significancia
Tratamientos	2	1.951	0.975	15	**
Error	57	3.706	0.065		
Diagnósticos	3	0.082	0.027	5.0845	**
TxD	6	0.165	0.027	5.0845	**
Error	171	0.923	0.005		
Total	239	6.828			

** Diferencia altamente significativa

Coefficiente de variación: 9.50%

Cuadro 4. Transmisión del virus ScYLV con *M. sacchari* y *P. saccharicida* (Comparación de medias)

Tratamientos	Evaluaciones (plantas ScYLV)				Media*
	1 ra.	2 da.	3 ra.	4 ta.	
<i>Myndus sacchari</i>	4	10	8	8	7.50 a
<i>Pezomachus saccharicida</i>	0	0	0	0	0.00 b
Control	0	0	0	0	0.00 b

*Duncan <0.05. Letras distintas indican diferencia significativa

De esta manera se confirmó bajo condiciones de invernadero que *M. sacchari* es vector de ScYLV, teniendo en cuenta lo indicado por Lockhart (2000) y Avellaneda (2002), dejando el acceso a la adquisición por un periodo de 48 horas ya que de acuerdo con Shenck (2002) este insecto transmite el virus.

Después de confirmada la inoculación y conociendo el vector de ScYLV, *M. sacchari* se comenzó a utilizar en los diferentes bioensayos para optimizar la metodología de transmisión del virus.

4.2. Desarrollo de metodología para transmitir el virus de la hoja amarilla (ScYLV)

4.2.1. Periodos de ayuno *Melanoplus sacchari*

De acuerdo a la evaluación realizada a los 3, 4 y 5 meses después de instalado el ensayo, el periodo de ayuno en los cuales se evidenció un mayor número de plantas positivas fue el de 30 minutos de ayuno (Cuadro 6), aunque estadísticamente no se detecto diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Periodos de ayuno de *M. sacchari* en la transmisión del virus ScYLV (ANDEVA)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F - Calculada	Significancia
Tratamientos	4	0.329	0.082	1.3925	ns.
Error	45	2.662	0.059		
Diagnósticos	2	0	0	0	ns.
Total	8	0.035	0.004	0.8036	
Error	90	0.486	0.005		
Total	149	3.511			

ns. no significativo

Coefficiente de variación: 9.65%

Cuadro 6. Periodos de ayuno de *M. sacchari* en transmisión del virus ScYLV (Comparación de medias)

Tratamientos (minutos)	Evaluaciones (plantas ScYLV)			Media*
	1 ra.	2 da.	3 ra.	
3	2	1	2	1.67
30	2	3	2	2.33
60	0	0	0	0.00
90	1	1	1	1.00
Testigo	0	0	0	0.00

De acuerdo con Satapaty (1998) el ayuno no mejora la eficiencia de transmisión de los insectos transmisores de los luteovirus. Sin embargo a lo observado en el trabajo era necesario someter a los insectos a este periodo con el fin de que iniciaran su proceso de alimentación una vez colocados sobre plántulas con el virus. Cuando no se sometían al ayuno, la mayoría de los insectos se desprendían de las plántulas sin haberse alimentado.

4.2. Periodos de acceso a la adquisición del virus ScYLV por *Melanaphis sacchari*

De acuerdo a la evaluación realizada a los 3, 4 y 5 meses después de instalado el ensayo, no se observó diferencia estadística entre los tratamientos (Cuadro 7 y 8) sin embargo fue evidente que en 48 horas de acceso a la adquisición, se obtuvo el mas alto nivel de infección de ScYLV.

Cuadro 7. Periodos de acceso a la adquisición por *M. sacchari* en la transmisión del virus ScYLV (ANDEVA)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F – Calculada	Significancia
Tratamientos	7	0.364	0.052	1.2414	Ns.
Error	72	3.017	0.042		
Repeticiones	2	0.035	0.017	2	Ns.
Error	14	0.104	0.007	0.8571	
Total	144	1.248	0.009		
Total	239	4.769			

Ns. no significativo

Coefficiente de variación: 12.37%

De este resultado, se confirma lo descrito por Scaliusi y Lockhart (2000) y Avellaneda *et. al.* (2002) de que el periodo de acceso a la adquisición de ScYLV por *M. sacchari* es de 48 horas y corroborado por Shenck (2001) sobre la naturaleza semipersistente del virus.

4.3. Periodos de acceso a la Inoculación del virus ScYLV por *Melanaphis sacchari*.

De acuerdo a la evaluación realizada a los 3, 4 y 5 meses después de instalado el ensayo, se observó un mayor número de plantas positivas con el acceso a la inoculación de 30 minutos, sin embargo no se vio reflejado estadísticamente (Cuadro 9 y 10).

Cuadro 8. Periodos de acceso a la adquisición por *M. sacchari* en la transmisión del virus ScYLV (Comparación de medias)

Tratamientos	Evaluaciones (plantas ScYLV)			Media*
	1 ra.	2 da.	3 ra.	
3 minutos	1	1	0	0.67
30 minutos	0	0	1	0.33
90 minutos	0	1	2	1.00
270 minutos	0	0	0	0.00
24 horas	1	2	2	1.67
48 horas	2	3	2	2.33
72 horas	0	1	1	0.67
Testigo	0	0	0	0.00

Cuadro 9. Periodos de acceso a la inoculación por *M. sacchari* en la transmisión del virus ScYLV (ANDEVA)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F - Calculada	Significancia
Tratamientos	4	0.336	0.084	1.5052	ns.
Repeticiones	45	2.514	0.056		
Diagnósticos	2	0.024	0.012	1.3404	ns.
Errores	8	0.028	0.003	0.383	
Total	90	0.815	0.009		
Total	149	3.718			

* no significativo

Coefficiente de variación: 12.45%

Cuadro 10. Periodos de acceso a la inoculación por *M. sacchari* en la transmisión del virus ScYLV (Comparación de medias)

Tratamientos (minutos)	Evaluaciones (plantas ScYLV)			Media*
	1 ra.	2 da.	3 ra.	
3	1	1	2	1.33
30	1	2	2	1.67
90	0	0	1	0.33
270	1	1	1	1.00
Testigo	0	0	0	0.00

4.3. Grado de preferencia del vector en cinco variedades comerciales y ocho clones ECSP del CINCAE.

De acuerdo al análisis realizado de las cuatro evaluaciones (Cuadro 11) existe diferencia significativa entre la preferencia y diagnósticos semanales. En el Cuadro 12, se puede observar la preferencia de *M. sacchari* a los Clones ECSP98-169, ECSP98-127 y ECSP98-168, con 108.13, 96.38 y 86.40 individuos promedio por planta respectivamente. Las variedades comerciales con mayor preferencia fueron PR 67-1070, con 101.58 áfidos por planta, mientras que con la variedad CR 74-250 no se estableció ningún insecto, demostrando una baja aceptación.

Cuadro 11. Preferencia de *M. sacchari* a variedades y clones promisorios de caña de azúcar (ANDEVA)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F - Calculada	Significancia
Bloque	9	2.915	0.324	1.162	ns.
Tratamientos	12	150.1	12.508	44.8802	**
Errores	108	30.1	0.279		
Diagnósticos	3	67.73	22.577	315.1662	**
TxD	36	24.086	0.669	9.3398	**
Errores	351	25.144	0.072		
Total	519	300.075			

ns. no significativo ** altamente significativo

Coefficiente de variación: 22.51%

La preferencia observada de *M. sacchari* por los clones ECSP del CINCAE en el ensayo, concuerda con lo observado en condiciones de campo por Mendoza, (2004) evidencio una infestación del 23.3 % para el clon ECSP98-169 y 13.33 % para ECSP98-127, tomando en cuenta el total de hojas infestadas, en evaluación realizada en el cantero 030233 del ingenio San Carlos.

Cuadro 12. Preferencia de *M. sacchari* a variedades y clones promisorios de caña de azúcar (Comparación de medias).

Tratamientos	Evaluaciones (áfidos/planta)				Media*	
	1 ra.	2 da.	3 ra.	4 ta.		
ECSP98-169	19.6	103.6	175.9	133.4	108.13	a
PR 67-1070	6.8	37.6	112.4	249.5	101.58	a
ECSP98-127	12.1	64	134.9	174.5	96.38	ab
ECSP98-168	20.4	100.7	114.4	110.1	86.40	ab
ECSP98-425	9.2	53.5	107.2	135.7	76.40	ab
ECSP98-392	8.6	24.5	53.7	115.2	50.50	abc
ECSP98-499	6.4	21.1	50.4	112.8	47.68	abc
RAGNAR	8.4	27.1	51.9	78.7	41.53	abc
ECSP98-419	1.9	4.8	9.9	26.5	10.78	bcd
CC 85-92	1.6	3.9	6.6	15.1	6.80	cd
B 76-78	3.6	4.8	8.1	8.3	6.20	cd
ECSP98-149	3.9	3.8	4.5	6.3	4.63	d
CR 74-250	0.5	0	0	0	0.13	d

* Tukey <0.05. Letras distintas indican diferencia significativa

Se esperaba observar una alta preferencia por la variedad B 76-78, de acuerdo a lo observado en el campo, pero los insectos que se establecieron y se multiplicaron a nivel experimental fue poca, es probable que debido a la edad de las plantas que se emplearon en la prueba (60 días), esta variedad no sea deseada por el insecto y necesita otras condiciones. Por esta razón sería recomendable repetir esta prueba en plantas de mayor edad.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones:

- La prueba DBIA, bajo nuestras condiciones experimentales, no fue adecuada para la detección temprana del virus ya que no se la pudo establecer.
- El áfido blanco, *Melanaphis sacchari*, transmite el virus de la hoja amarilla ScYLV.
- El saltahoja hawaiano, *Perkinsiella saccharicida*, no transmitió el virus de la hoja amarilla con los parámetros empleados en el ensayo.
- Los niveles más altos de transmisión del ScYLV con *M. sacchari*, se presentaron con 30 min. de ayuno del insecto, un periodo de acceso a la alimentación de 48 horas sobre plantas enfermas y con periodo de acceso a inoculación del virus de 30 min. sobre plantas sanas.
- De 13 materiales de caña de azúcar probados, la variedad PR 67-1070 y el clon ECSP98-169 del programa de variedades del CINCAE, presentaron preferencia por *M. sacchari*. Las variedades CR 74-250 y el Clon ECSP98-149 tuvieron menor preferencia por el insecto.

5.2. Recomendaciones:

- Realizar un diagnóstico de hospederos alternos de *M. sacchari*, en lotes comerciales.
- Analizar insectos chupadores naturales y ocasionales en el cultivo de la caña de azúcar en Ecuador a partir de muestreos de campo.
- Evaluar la preferencia del áfido *M. sacchari*, hacia plantas de caña de azúcar con mas edad (4 – 5 meses).

6. BIBLIOGRAFÍA

- AGRIOS, G. 1996.** Enfermedades causadas por Virus. Fitopatología. 2. edición. México. pp 648-668.
- AVELLANEDA, M. 2002.** Resistencia de diferentes variedades de caña de azúcar (Híbrido de *saccharum* sp.) al virus del Síndrome de la hoja amarilla (Sugarcane Yellow Leaf Luteovirus) Empleando al áfido *Melanaphis sacchari* como vector de transmisión. Tesis Microbiología Industrial, Bogota – Colombia. Universidad Javeriana. 68 pp.
- AVELLANEDA, M.; ANGEL, J. y VICTORIA, J. 2003.** Sugarcane Pathology workshop VII. Louisiana state University Baton Rouge. Louisiana – USA. pp. 11 – 16.
- AVELLANEDA, M.; ANGEL, J. VICTORIA, J.; BETANCOUL, M.; DIAZ-GRANADOS, C.; ARROYAVE, J.; CASTAÑO, M. 2001.** Purificación del virus de síndrome de la hoja amarilla ScYLV y producción de antisueros
- ANGEL, J.; ANGEL, F. y VICTORIA, J. 2001.** Razas del síndrome de la hoja amarilla en Colombia. CENICAÑA, Carta trimestral 2: 9 – 11.
- BUSTILLO, A. 1988.** Descripción de áfidos que atacan la papa en Colombia con una clave para su identificación. ICA. 30 p.
- BUSTILLO, A. y SÁNCHEZ, E. S/F.** Los afidos en Colombia. Plagas que afectan los cultivos Agrícolas de Importancia Económica. ICA. 96.p
- COMSTOCK, J.; MILLER, J.; TAY, P. y FOLLIS, J. 1999.** Sugarcane yellow leaf virus in Florida: Incidence and resistance. En: Proceeding of the XXIII ISSCT Congress. Nueva Delhi, India. Vol. 2 pp. 366 – 372.
- CONGÉ, C.; TYMON, A.; JONES, P. y BAILER, R. 1998.** Association of a phytoplasma with a yellow leaf syndrome of sugarcane in Africa. En: Ann. Appl. Biol. 133: 177 – 186.

- GARCÉS, F. 2003.** Informe de avance Tesis, "Diagnóstico serológico y molecular del virus del síndrome de la hoja amarilla, el raquitismo de la soca y la escaldadura de la hoja en Ecuador. Programa de Biotecnología. Universidad de Guayaquil. Guayaquil Ecuador, 4 p.
- _____. **2003.** Manejo preventivo de los problemas fitosanitarios en el cultivo de la caña de azúcar en Ecuador. Boletín divulgativo CINCAE.
- _____. **2002.** Diagnóstico de enfermedades. Informe de avance 2002. Fitopatología. CINCAE. 7 p.
- _____ y **VALLADARES, C. 2001.** Diagnóstico del síndrome de la hoja amarilla en el Ecuador. CINCAE, Carta Informativa. Año 3 No. 6 Guayaquil Ecuador. pp. 6 – 16.
- GENBANK. 2004.** Taxonomía genbank luteoviridae.htm. (En línea). El Triunfo, Ecuador. Consultado 7 de Octubre del 2004. Disponible en info@ncbi.nlm.nih.gov
- GUZMÁN, M. y VICTORIA, J. 2000.** Evaluación de cinco enfermedades de la caña de azúcar mediante Dot – blot y Tissue – blot a partir de la misma muestra de tejido. Memoria. Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines ASCOFI. Cali – Colombia. 50 p.
- LIMA, N.; CHINEA, N. y ESCALONA, J. 1995.** Síndrome de Amarillamiento Foliar de la Caña de Azúcar: Situación actual en Brasil. Departamento de Protección de plantas. INICA, MINAZ.
- INEC. 2004.** Instituto Ecuatoriano de Estadísticas y Censos, Resultado III Censo Nacional Agropecuario. Ecuador. Consultado el 24 del 2004. Disponible em: www.inec.gov.ec
- LOCKHART, B. 2000.** Yellow Leaf Syndrome of sugarcane: Recognizing viral and non viral causes. En: V Congreso de ATALAC – XIII Congreso de ATACA y XIV Congreso de ATACORI. pp. 226 – 231.

- _____. 1996. Sugarcane bacilliform virus sugarcane mild mosaic virus y sugarcane yellow Leaf Syndrome En: Sugarcane germoplasm consevation and exchange. Croft B, Piggin, C, Willie, G, And Hogarth, D., (eds) ACIAT Proc. 367- 134 p.
- LOCKHART, B. y CRONGÉ, C. 2000.** Yellow leaf syndrome. En: Rott, P.; Bailey, R.; Comstock, J.; Croft, B. y Sauntally, S. A guide to sugarcane diseases. CIRASSCT. pp. 191 – 295.
- LOCKHART, B.; IREY, M. y COMSTOCK, J. 1995.** Sugarcane bacilliform virus, Sugarcane mild mosaic virus and Sugarcane yellow leaf syndrome. En: Croft, B.; Piggin, C. and Hogarth D. (eds.) Sugarcane Germoplasm Conservation and Exchange. Queensland, Australia. ACIAR Proceedings No. 67. 134. p.
- MENDOZA, J. 2003.** Manejo de insectos y Roedores en caña de azúcar en el Ecuador en: El cultivo de la caña de azúcar en el Ecuador. Asociación Ecuatoriana de Tecnólogos de la Caña de Azúcar (AETA). Guayaquil - Ecuador. 31-46 pp.
- _____, **MARTINEZ, I.; ALVAREZ, A.; AYORA, A. y LUZURIAGA, V. 2001.** Manejo del saltahojas de la caña de azúcar, *Perkinsiella saccharicida* (Homoptera: Delphacidae), en el Ecuador. En: Primer taller latinoamericano sobre plagas de la caña de azúcar. Ed. Buenaventura, C. Asociación de tecnoloogo azucareros de Latinoamérica y el Caribe. Guayaquil – Ecuador. pp. 17 – 22.
- MEMORIA XXIV.** Congreso de Asociación Colombiana de Fitopatología a Ciencias Afines (ASCOLFI) Medellín Colombia 11-13 de Julio del 2001. p 47.
- MOONAN, F. y MIRKOV, E. 2001.** Analyses of Genotypic Diversity among North, South, and Central American Isolates of *Sugarcane Yellow Leaf Virus*: Evidence for Colombian Origins and for Intraspecific Spatial Phylogenetic Variation. En: Journal of Genenal Virology. Vol. 76, No. 3. pp. 1339 – 1348.
- MOONAN, F. y MIRKOV, E. 1999.** Development of methods for pathogen identification and of conventional and monoconventional strategies for contrd of yellow leaf syndrome of sugarcane. Reporte final.

- SCAGLIUSI, M. y LOCKHART, B. 2000.** Transmission, Characterization and Serology of a Luteovirus Associated with Yellow Leaf Syndrome of Sugarcane. *Phytopathology* 90: 120 – 124.
- SHENCK, S. y LEHRER, A. 2000.** Factors Affecting the transmission and of sugarcane yellow leaf virus. *En: Plant Disease*. Vol. 84 No. 10. pp. 1085 – 1088.
- _____ ; **LOCKHART, B. 1997.** Uso de la impresión de tejidos de inmunoabsorción para determinar la distribución del Sugarcane Yello leaf virus en Hawai. *Sugarcane Issue* N° 4 Julio. Agosto.
- SICA, 2004.** Servicio de información agropecuaria del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador. Superficie de caña cultivada y cosechada, producción de caña y azúcar, rendimientos en campo y fábrica. Ecuador. Consultado 10 May. 2003, disponible en <http://www.sica.gov.ec/censo/docs/nacionales/tabla3.htm>
- SMITH, G.; BORG, Z.; LOCKHART, B.; BRAITWAITE, K. y GIBBS, M. 2000.** Sugarcane Yellow leaf virus: a novel member of the luteoviridae that probably arose by inter-species. *En: Journal of Genenral Virology*. 81: 1865 – 1969.
- SIGVALD, K. 1998.** Forecasting Aphid-borne. Virus diseases. Chapter 13. in *Plant Virus Disease Control*. Government of Canada. p.172
- VEGA, J.; SCAGLIUSI, M. y ULIAN, J. 1997.** Sugarcane yellow leaf disease in Brazil: Evidence of association with a luteovirus. *Plant diseases*. 81: 21 – 26.
- VICTORIA, J.; GARCÉS, F.; GUSMÁN, M. y ANGEL, F. 1998.** Síndrome de la hoja amarilla en Colombia ScYLV (Sugarcane yellow leaf virus). *CENICAÑA, Carta trimestral* 20 (2 y 3): 3 -7.
- _____ ; **CUERVO, E.; GUSMÁN, M. y CALDERON, M. 2000.** Efecto del Síndrome de la hoja amarilla sobre la producción de la caña de azúcar en le Valle del Cauca. *Memoria V Congreso Colombiano de la Asociación de Técnicos de la Caña de Azúcar* 4-6 de Octubre del 2000. Cali- Colombia.

ANEXOS

Cuadro 4A. Resultado de diagnóstico de la verificación en transmisión de ScYLV por *M. sacchari* y *P. saccharicida* (3, 4, 5 y 6 meses después de la transmisión).

Resultados Diagnóstico ScYLV								
Planta	<i>M. sacchari</i>				<i>P. saccharicida</i>			
	3 mdt	4 mdt	5 mdt	6 mdt	3 mdt	4 mdt	5 mdt	6 mdt
1	-	+	+	+	-	-	-	-
2	+	+	+	+	-	-	-	-
3	+	+	+	+	-	-	-	-
4	-	+	+	+	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	+	+	+	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	+	+	+	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	+	+	+	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-
14	+	+	+	+	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	+	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	+	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-
Total (+)	4	10	8	8	0	0	0	0

Cuadro 6A. Transmisión del ScYLV con diferentes periodos de ayuno de *M. sacchari* (3, 4 y 5 meses después de la transmisión).

Resultados Diagnóstico ScYLV - Tiempos de ayuno (min.)												
Planta	0			30			60			90		
	3 mdt	4 mdt	5 mdt	3 mdt	4 mdt	5 mdt	3 mdt	4 mdt	5 mdt	3 mdt	4 mdt	5 mdt
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
4	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total (+)	2	1	2	2	3	2	0	0	0	1	1	1

Cuadro 10A. Transmisión del ScYLV con diferentes periodos de inoculación del virus con *M. sacchari* (3, 4 y 5 meses después de la transmisión).

Resultados Diagnóstico ScYLV - Tiempos de inoculación (min.)												
Planta	0			30			90			270		
	3 mdt	4 mdt	5 mdt	3 mdt	4 mdt	5 mdt	3 mdt	4 mdt	5 mdt	3 mdt	4 mdt	5 mdt
1	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
9	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
10	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total (+)	1	1	2	2	3	3	0	0	1	1	1	1

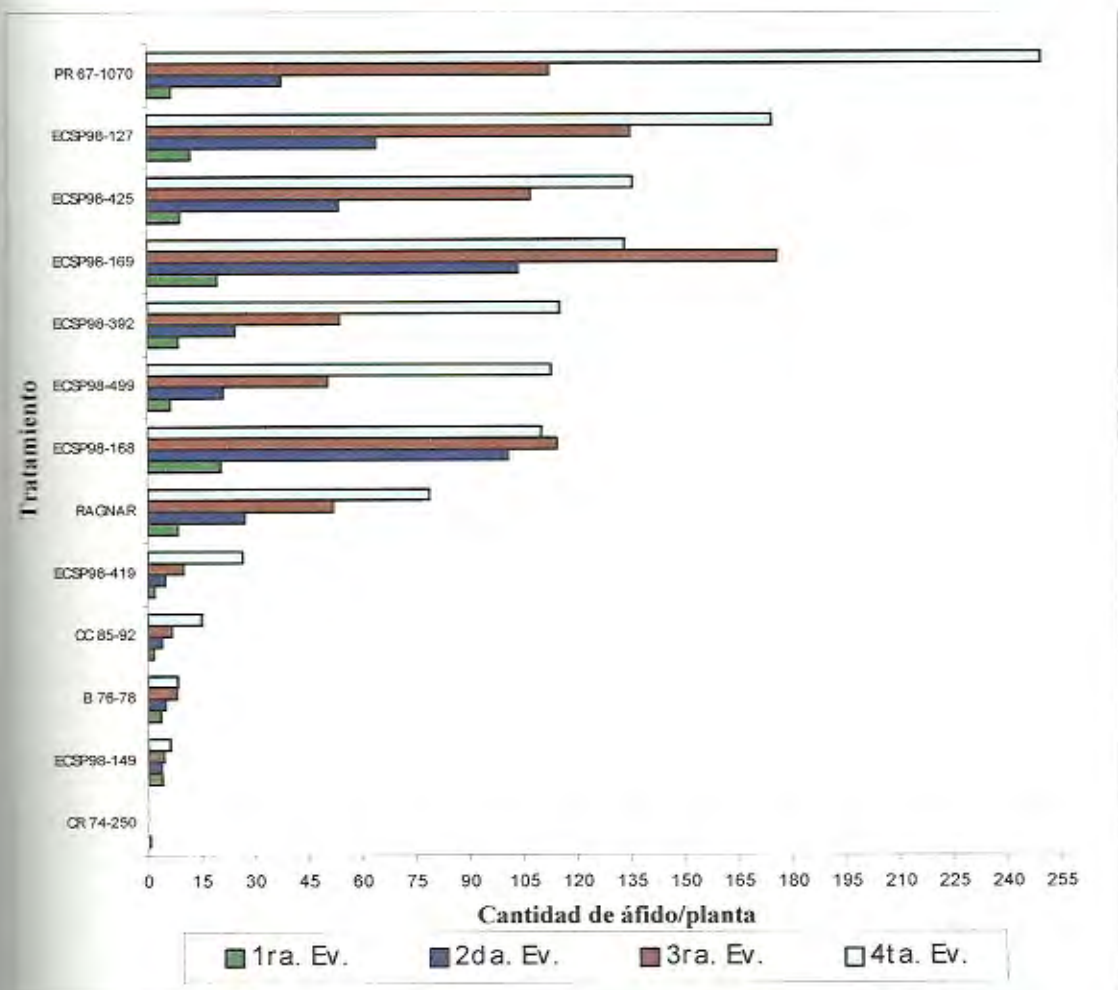


Figura 13. Crecimiento de las colonias de *M. sacchari*, en el tiempo (CINCAE).