ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción

"Manejo del virus de la hoja amarilla (*Sugarcane Yellow Leaf Virus*, SCYLV) de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) mediante cultivo de tejidos y el uso de agentes inductores de Resistencia Sistémica Adquirida, SAR"

TESIS DE GRADO

Previo a la Obtención del Título de:

MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA CON MENCIÓN EN AGRICULTURA ORGÁNICA

Presentada por:

Ing. Roberto Carlos Burbano Villavicencio

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2009

AGRADECIMIENTO

Quiero dejar constancia de mi eterno agradecimiento al Centro de Investigaciones de la Caña de Azúcar del Ecuador (CINCAE), por todo el aporte científico y logístico para la culminación exitosa de esta investigación. Particularmente al Ing. Freddy Garcés, Dr. Raúl Castillo, Ing. Jorge Mendoza e Ing. Edison Silva.

Al Ing. Alberto Ortega, por su soporte constante a lo largo de toda mi colegiatura y durante el desarrollo de esta investigación.

Finalmente, al Programa Alimentario PL-480 por el apoyo y soporte complementario del PMBA–ESPOL.

DEDICATORIA

A Dios, ser supremo que rige nuestros pensamientos, pues sin su acción sería vano nuestro esfuerzo por encontrar respuestas a los interrogantes que nos plantea la naturaleza.

A mis padres Roberto y Cecilia, quienes siempre estuvieron a mi lado, constituyendo un estímulo para alcanzar mis metas trazadas.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Ing. Jorge Abad M.
SUBDECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE

Dr. Raúl Castillo O.
DIRECTOR DE TESIS

Dr. Efrén Santos O.
VOCAL

Ing. Alberto Ortega U.
VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL".

Roberto Carlos Burbano Villavicencio

RESUMEN

El presente trabajo busca alternativas para el manejo del virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar (SCYLV), combinando la obtención de semilla sana libre del virus y su posterior manejo para reducir las reinfecciones en campo debidas a la presencia del áfido blanco (*Melanaphis sacchari* Zehnt), vector del virus. Para el efecto se planteó la aplicación de herramientas de cultivo de tejidos; como son: la extracción de meristemos, inducción de callos embriogénicos y la utilización del viricida Ribavirín (Virazole); así como, el uso del ácido salicílico (AS), que actúa como elicitor en las respuestas de Resistencia Sistémica Adquirida (SAR). Adicionalmente a los tratamientos *In Vitro*, se utilizaron los controles de termoterapia y agua caliente. La menor incidencia del virus fue observada en las plantas tratadas con el inductor AS y en los explantes sometidos a la inducción de callos embriogénicos, seguidas de la extracción de meristemos y la aplicación de Ribavirín, que presentaron el mismo nivel de significancia estadística; mientras que, los tratamientos sometidos a termoterapia y agua caliente mostraron los niveles más altos de incidencia. El ensayo de campo para observar la reinfección de plantas meristemáticas con el SCYLV, consistió en analizar el efecto de la aplicación preventiva del insecticida sistémico imidacloprid (Confidor), alternado con acefato (Orthene), combinando con los inductores de SAR: el AS y un Kit comercial (Releaf-Stoler Co.). Tanto los insecticidas como los

inductores se aplicaron hasta los ocho meses de edad a intervalos mensuales. La protección de las plantas meristemáticas, con la combinación de insecticidas e inductores de SAR, fue significativa, comparadas con el testigo sin tratamiento, a los 2, 4 y 8 meses después del transplante. En ambos ensayos, los diagnósticos virales fueron efectuados utilizando la técnica inmunoenzimática Tissue blot Immunoassay (TBIA).

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN……..……..VI

ÍNDICE GENERAL……..……..VIII

GLOSARIO……..……...XIII

ÍNDICE DE TABLAS……..……..…....XVI

ÍNDICE DE FIGURAS……..…...…XVII

ÍNDICE DE GRÁFICOS……..……XVIII

INTRODUCCIÓN……..1

CAPITULO 1

1. GENERALIDADES …….…….....…...2

1.1. Antecedentes……..…2

1.2. Categorización de semilleros de caña de azúcar……..…..……4

1.3 Características del virus SCYLV……..……..……...5

1.4. Insectos vectores y diseminación del virus……..…6

1.5. Alternativas para la eliminación de virus en caña de azúcar…….7

1.5.1. Cultivo de meristemos 7

1.5.2. Inducción de callos embriogénicos..... 8

1.5.3. Tratamiento térmico y termoterapia..... 10

1.5.4. Tratamiento químico (agentes antivirales)..... 12

1.5.5. Inducción de Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) 13

1.6. Técnicas utilizadas para el diagnóstico viral..... 16

1.7. Objetivos 18

1.7.1. Objetivo general 18

1.7.2. Objetivos específicos..... 18

CAPITULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS ……..……..……..19

2.1. Localización geográfica..... 19

2.2. Empleo de técnicas de cultivo de tejidos para la limpieza de SCYLV en la variedad CR74-250. 20

2.2.1. Recolección de material enfermo 20

2.2.2. Obtención de semilla enferma, aplicación de tratamiento con agua caliente y siembra en bandejas. 20

2.2.3. Aplicación de la termoterapia. 21

2.2.4. Establecimiento en medio MS I y MS II. 22

2.2.5. Enraizamiento de plántulas en medio MS III. 23

2.2.6. Inducción de callos embriogénicos..... 24

2.2.7. Organogénesis indirecta a partir de callos embriogénicos 26

2.2.8. Aplicación de viricida y acido salicílico 28

2.2.9. Factores y tratamientos en estudio de ensayo *In vitro* 29

2.2.10. Diseño experimental..... 31

2.2.10.1. Unidad experimental..... 31

2.2.10.2. Número de repeticiones y observaciones 31

2.2.10.3. Análisis de datos..... 32

2.2.11. Variables en estudio de ensayo *In Vitro* 32

2.2.11.1. Grado de fenolización……..…….32

2.2.11.2. Número de brotes por explante……33

2.2.11.3. Incidencia del virus SCYLV……..33

2.3. Evaluación de inductores de resistencia sistémica adquirida (SAR) e insecticida para evitar la incidencia del virus de la hoja amarilla (SCYLV) en la variedad B7678, bajo condiciones de campo..... 34

2.3.1. Siembra del material vegetal en condiciones de campo .. 34

2.3.2. Factores y tratamientos en estudio de ensayo de campo 35

2.3.3. Diseño experimental..... 38

2.3.3.1. Unidad experimental y número de repeticiones..... 39

2.3.3.2. Análisis de datos..... 39

2.3.4. Variables en estudio de ensayo de campo..... 39

2.3.4.1. Incidencia del virus SCYLV……..……39

2.3.4.2. Producción de toneladas de caña por hectárea (TCH)… ……..……..…..40

2.3.4.3. Toneladas de azúcar por hectárea (TAH)……40

2.3.4.4. Evaluación de la dinámica poblacional de *Melanaphis sacchari* Zehnt……..……...40

CAPITULO 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN ……..……..42

3.1. Empleo de técnicas de cultivo de tejidos para la limpieza de SCYLV en la variedad CR74-250……..…….....……...……42

3.1.1. Aplicación de tratamiento con agua caliente….....…….42

3.1.2. Aplicación de termoterapia……..……..……..……....43

3.1.3. Establecimiento en medio MSI y MSII…….....……..43

3.1.4. Acción del viricida Ribavirín……..……..…….44

3.1.5. Grado de fenolización……..…….……...…...45

3.1.6. Número de brotes por explante…….……..…….46

3.1.7. Incidencia del virus SCYLV…….……..……47

3.2. Evaluación de inductores de resistencia sistémica adquirida (SAR) e insecticidas para evitar la incidencia del virus de la hoja amarilla (SCYLV) en la variedad B76-78, bajo condiciones de campo…….……...……..…….49

3.2.1. Incidencia del virus SCYLV en plantas colonizadas por *M. sacchari*……..……..……..…….. 49

3.2.2. Efecto simple de los inductores sobre la incidencia de SCYLV…….…….....51

3.2.3. Efecto simple de los insecticidas sobre la incidencia de SCYLV……..……..……...54

3.2.4. Efecto en el tonelaje de caña cosechada……..……..……55

3.2.5. Efecto en el rendimiento azucarero (KATC)……...……57

3.2.6. Dinámica poblacional del áfido blanco *Melanaphis sacchari* Zehnt……..……..……..….58

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.…….....…….……..60

APENDICES……..…….……....64

BIBLIOGRAFÍA……..……..…..72

GLOSARIO

Anticuerpo. Sustancia existente en el organismo animal**,** o producida en él como respuesta a la introducción de un antígeno, que se opone a la acción de otros elementos, como bacterias, toxinas, etc.

Antígeno. Toda molécula de origen bacterial, viral o fúngica que a penetrar en un organismo animal, reacciona con los productos resultantes de la inmunidad celular o humoral (anticuerpos) y desencadena una reacción inmunitaria.

Apoptosis. Ver PCD (muerte celular programada).

Elicitor. Cualquier molécula capaz de activar los mecanismos de defensa en las plantas. Con frecuencia puede ser una proteína producida por algún patógeno.

Patógeno. Se dice del elemento de origen biótico, incluyendo a los virus; que origina y desarrolla una enfermedad.

PCD. Acrónimo de muerte celular programada (*Programed Cellular Death,* por sus siglas en inglés), también llamada **apoptosis** la cual es el resultado

de una reacción de hipersensibilidad y en la que el tejido celular vegetal muere a causa de un evento celular natural el cual también puede ser inducido por condiciones patológicas.

PCR. Acrónimo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction* por sus siglas en inglés) y hace referencia a una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo. En teoría basta partir de una única copia de ese fragmento.

Receptor. Cualquier molécula, por lo general de naturaleza proteica, que se encuentra en las membranas celulares y se encarga de recibir la información transmitida por un elicitor u otra molécula transductora de señales en las células.

SAR. Siglas de Resistencia Sistémica Adquirida (*Systemic Adquired Resistance);* y se refiere a los mecanismos de defensa activados por un elicitor o en respuesta al ataque de patógenos. En este proceso se activan numerosos genes cuyos productos degradan la pared celular de bacterias u hongos, destruyen células infectadas, entre otros eventos.

Variación Somaclonal. Cambios en la constitución genética de un tejido vegetal al ser sometido a condiciones de stress como radiación y/o altas concentraciones de reguladores de crecimiento.

Vector. Cualquier organismo, por lo general de la clase insecta o protozoa; que se encarga de la transmisión de enfermedades desde un individuo enfermo hasta uno sano, mediante la succión de los líquidos celulares.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de los factores y tratamientos en estudio de ensayo *In Vitro*…..……..……..……29

Tabla 2. Descripción de los factores y tratamientos en estudio en ensayo de campo.……..……37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Plántulas sometidas a termoterapia a 41° C durante 15 días…22

Figura 2.2. Crecimiento y multiplicaciòn de plántulas meristemàticas..... 23

Figura 2.3. Desarrollo de raíces en medio líquido MS III..... 24

Figura 2.4. Inducción de callos en medio sólido enriquecido con 2,4-D..... 25

Figura 2.5. Formación de puntos verdes a partir de callos embriogènicos en ausencia de 2,4-D 27

Figura 2.6. Regeneración de plantas en medio sólido carente de 2,4-D.... 27

Figura 2.7. Plantas regeneradas a partir de callos embriogénicos..... 28

Figura 2.8. Especímenes ápteros y alados del áfido *M. sacchari* Zehnt ... 35

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 3.1. Grado de fenolización (escala de 0 a 3) de plantas *In Vitro* var. *CR74-250.* 45

Gráfico 3.2. Número de brotes por explante de plantas *In Vitro* var CR74-250……..……..……..46

Gráico 3.3. Incidencia del virus SCYLV en plantas de la variedad CR74-250 tratadas In Vitro, con agua caliente y termoterapia 48

Gráfico 3.4. Porcentaje de plantas sanas e infectadas por SCYLV, colonizadas por *M. Sacchari*..... 50

Gráfico 3.5. Fluctuación poblacional de *M. sacchari* e incremento de la incidencia del virus SCYLV..... 51

Gráfico 3.6. Incidencia de SCYLV a los dos meses de iniciado el cultivo en plantas de la variedad B76-78 52

Gráfico 3.7. Incidencia de SCYLV a los cuatro meses después del trnasplante..... 53

Gráfico 3.8. Incidedncia de SCYLV a los ocho meses de iniciado el cultivo en plantas de la variedad B76-78..... 54

Gráfico 3.9. Efecto de la aplicación de insecticida sobre la incidencia del virus SCYLV 55

Gráfico 3.10. Efecto de los inductores de resistencia (SAR) en el tonelaje de caña por hectárea (TCH). 56

Gráfico 3.11. Curvas de isoproductividad mostrando el efecto indirecto de la aplicación de inductores de SAR, para prevenir la infección de SCYLV 57

Gráfico 3.12. Relación entre la dinámica poblacional de *M. sacchari* y la precipitación pluvial 59

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de esta investigación comprende la búsqueda de plantas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) libres del virus SCYLV (Sugarcane Yellow Leaf Virus), mediante el empleo de técnicas de cultivos de tejidos, utilización de un viricida y el uso de inductores de Resistencia Sistémica Adquirida (SAR). Para el efecto, se utilizaron plantas de caña de azúcar infectadas con el virus SCYLV y sometidas a termoterapia, extracción de meristemos e inducción de callos embriogénicos *In Vitro*. A estas plantas se les aplicó el viricida Ribavirín y ácido salicílico (AS) (aplicados al medio de cultivo) con el objetivo obtener plantas sanas libres del virus.

Adicionalmente se estableció un ensayo de campo en el que se cultivaron plantas *In Vitro* y asperjadas por los inductores SAR, los inductores Kit Releaf (Stoler Co.) y AS, con el fin de estimular los mecanismos SAR en las plantas y evitar las reinfecciones con el virus SCYLV en campo. Al empleo de estas moléculas se sumó la aplicación de insecticidas con el propósito de evitar la acción de *Melanaphis sacchari*, vector del virus.

Tanto en el ensayo de laboratorio como en el ensayo de campo, se tomaron muestras de hojas de las plantas sometidas a los distintos tratamientos para evaluar la presencia o ausencia del virus y determinar la eficacia o nulidad de las técnicas y moléculas empleadas en la investigación.

CAPÍTULO 1

1. GENERALIDADES

1.1. Antecedentes

El sector cañicultor es uno de los de mayor dinamia en el Ecuador; puesto que el cultivo de caña de azúcar posee una importancia económica y social preponderante, generando empleo en la época de zafra a 30000 personas directamente y 80000 indirectamente, pertenecientes al sector rural principalmente. Esta actividad contribuye con el 1.4% al PIB nacional y con el 12% al PIB agrícola (28).

Las enfermedades de tipo sistémico, como es el virus de la hoja amarilla (SCYLV), afectan directamente el desarrollo de la caña de azúcar generando importantes pérdidas en el rendimiento de las plantaciones. Los diagnósticos han encontrado canteros comerciales

con altos niveles de incidencia, especialmente del virus baciliforme de la caña de azúcar (SCBV) en las variedades Ragnar, B76-78 y SSP-98127; mientras que, SCYLV se ha detectado en las variedades CR74-250, Ragnar, B76-78, PR67-1050, CC85-92 y SP84-5560, entre otras (12).

Las infecciones del virus presentan una incidencia promedio del 26.31% en los tres ingenios azucareros más importantes del país (San Carlos, Ecu-dos y Valdez) y con niveles máximos de hasta 99.3 % de infección, distribuidos en el 73.82% de los canteros evaluados, particularmente en los ingenios San Carlos y Valdez (12).

El CINCAE ha establecido un sistema de limpieza y multiplicación de semilla sana y diagnóstico de enfermedades para el establecimiento de semilleros sanos, donde se garantiza la sanidad de la semilla. Por otro lado, para la importación de variedades, existe un proceso cuarentenario, en el cual esas mismas técnicas son utilizadas para su indexación (12). Dentro de este proceso se cuenta con la producción de semilla sana mediante la micropropagación in vitro. En esta técnica se emplean meristemas apicales que están libres de contaminación y muestran rápido crecimiento y división celular (25).

1.2. Categorización de semilleros de caña de azúcar.

En CINCAE, para la certificación en cada uno de los semilleros se utilizan criterios fitosanitarios, desde la semilla generada *in Vitro* (multiplicación y limpieza inicial), continuando con el establecimiento de semilleros Fundación o prebásicos (multiplicación y limpieza masiva), hasta los semilleros convencionales (multiplicación convencional y limpieza final) (11). Estos semilleros se clasifican de la siguiente manera:

- **Semillero fundación.** Este semillero se debe establecer en un área en lo posible aislada, en el que se siembran las variedades promisorias desarrolladas por los centros de investigación pertinentes y las variedades comerciales de interés de los ingenios azucareros, multiplicadas mediante cultivo de tejidos (11).

- **Semillero básico.** Este semillero se establece con semilla seleccionada a partir del semillero Fundación. Se puede obtener a partir de plántulas de yemas individuales a partir del semillero Fundación, o mediante la siembra de paquetes de semilla como se realiza convencionalmente (11).

- **Semillero semi-comercial.** Se establecen en las plantaciones de los ingenios azucareros, utilizando semilla proveniente del semillero básico, la cual es cortada entre los 7 y 9 meses de edad (11).

- **Siembra comercial.** Se establece en plantaciones de los ingenios, utilizando semilla proveniente del semillero semi-comercial, la cual es cortada entre los 7 y 9 meses de edad (11).

1.3. Características del virus SCYLV

El virus SCYLV es considerado un Polerovirus de la familia Luteoviridae, que posee un genoma compuesto por ARN de una sola banda de cinco a ocho Kb; y al igual que los demás virus de este grupo se encuentra limitado al floema. La proteína de la cápside tiene una masa molecular relativa de 27 KDa y no es glicosilada. Las partículas virales son de forma circular y poseen un diámetro de 22 a 24 nm (20).

Inicialmente la enfermedad estaba asociada con dos patógenos, el fitoplasma Sugarcane yellow phytoplasma (SCYP) y el virus Sugarcane yellow leaf virus (SCYLV). Estos autores finalmente concluyeron que se trata de dos organismos diferentes. El primero

de ellos fue diagnosticado mediante la técnica molecular denominada Nested-PCR, utilizando los primers R16F2n y R16R2, obteniendo una banda de 1250 pb de 16SrDNA; y, para el caso del virus se empleó RT-PCR, obteniendo un fragmento amplificado de 352 pb, utilizando los primers YLS 462 y YLS 111 (23, 24).

1.4. Insectos vectores y diseminación del virus

Existen varios insectos vectores que trasmiten el virus SCYLV de manera no persistente, entre los cuales se encuentran el áfido blanco (*Melanaphis sacchari* Zehnt), el áfido del maíz (*Rhopalosiphum maidis*) y el áfido blanco del arroz (*R. rufiabdominales*); conociéndose además que no es transmitido mecánicamente (30).

Se han realizado estudios en el que durante dos estaciones de crecimiento de la caña de azúcar, el mayor incremento en los niveles de infección de la enfermedad de la hoja amarilla coincidió con el incremento en los índices de infestación del áfido blanco, *M. sacchari* Zehnt (16).

En otras investigaciones, se encontró que la dispersión de la enfermedad estuvo ligada a los altos niveles de población del áfido

blanco alados (*M. sacchari*) y fue seguida por una infección vecina debido probablemente al movimiento de los áfidos de planta a planta (9). Estos resultados concluyen que la infección primaria de plantas libres de la enfermedad debida a los áfidos alados, es baja y ocurre durante el primer estado de crecimiento (3 a 4 meses). A partir de este momento, la infección ocurre a partir de las primeras plantas infectadas (9).

1.5. Alternativas para la eliminación de virus en caña de azúcar

1.5.1. Cultivo de meristemos

Aunque los meristemas apicales son a menudo libres de virus, esto no puede ser contemplado como un fenómeno de ocurrencia universal (21). Existe suficiente evidencia para sugerir que algunos virus invaden la región meristemática de los ápices en crecimiento. Algunos de los virus conocidos por invadir la región meristemática de los ápices de los brotes son el Virus del mosaico del tabaco (TMV), virus X de la papa (PXV) (Mori, 1977) y el virus del mosaico del pepino (CMV) (Walkey y Cooper, 1972) (21,22).

Luego de la termoterapia, en la limpieza de semilla *in vitro*, el meristema que se extrae es lo más pequeño posible,

alcanzando unos 2 mm de largo. Este meristemo se extrae asépticamente bajo una cámara de flujo laminar horizontal, con la ayuda de un estereomicroscopio. Se coloca en medio de cultivo MS I basado en las sales de Murashige y Skoog (1962) o medio de establecimiento, que le permite crecer (elongarse) bajo oscuridad y en agitación. Luego de 15 días, este meristemo se coloca en el medio de multiplicación denominado MS II. Este medio, rico en citocininas, provoca una proliferación de tallos laterales. Estos tallos laterales pasarán al medio de enraizamiento o MS III con contenidos de auxinas y una reducción de citoquininas (3).

En los trabajos de investigación realizados por Comstock y Miller (2001), existieron diferencias considerables en las toneladas de caña por hectárea y toneladas de azúcar por hectárea, del 4 y 8%, respectivamente; en plantas obtenidas por cultivo de tejidos y las plantas tratadas con agua caliente (6).

1.5.2. Inducción de callos embriogénicos

Una alternativa que puede ser viable para la eliminación de virus que invaden el meristemo es la inducción de callos, la

cual consiste en el tratamiento de los explantes con sustancias como el 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacetico). Los resultados de ensayos recientes demuestran que la aplicación de 2,4-D en concentraciones de 3 $mg.L^{-1}$ induce un desarrollo adecuado del tamaño del callo (31).

La hormona 2,4-D se utiliza para la obtención de callos, los cuales sirven para la regeneración de plantas y la obtención de suspensiones celulares a partir de tejidos vegetales, con el objeto de inducir mutagénesis y obtener nuevas variedades. El 2,4-D tiene acción especial en las plantas, actuando como regulador de multiplicación celular a bajas concentraciones y es tóxico a niveles altos, por lo que es utilizado como herbicida selectivo y también en el tratamiento de la caída de los frutos (25).

En varios ensayos con caña de azúcar se emplearon medios para inducción de callos utilizando 2,4-D en concentraciones de $6.7g.L^{-1}$. Los callos embriogénicos fueron subcultivados a intervalos mensuales y regenerados en un medio desprovisto de 2,4-D (24). La limpieza a través de callos requiere de menos cuidado que el cultivo de meristemos y todas las

plantas regeneradas están libres de virus. Sin embargo, el cultivo de callos debe ser tratado cuidadosamente debido a una posible variación somaclonal (24).

En los ensayos antes descritos se obtuvieron plantas 100% libres de virus al someterlas a la inducción de callos embriogénicos, indicando además que un simple subcultivo de callo fue suficiente para obtener limpieza, tanto de SCYLV como de SCYP (24).

1.5.3. Tratamiento térmico y termoterapia

Otra de las alternativas para la obtención de plantas libres de enfermedades sistémicas es el tratamiento térmico. Para iniciar un tratamiento de termoterapia en plántulas de caña de azúcar se requiere inicialmente obtener yemas de tallos de plantas con una edad de 8 a 10 meses de edad. Se corta un pedazo de aproximadamente 3.5 cm de largo con poca cantidad de tejido del tallo, que protege a la yema. Posteriormente, las yemas se someten a un pre-tratamiento colocándolas en agua caliente a una temperatura de 50º C por diez minutos, se dejan reposar por 8 – 12 horas y

finalmente son tratadas en agua caliente a 51º C por una hora (3).

Las yemas tratadas se sumergen en una solución de Folicur 250 CE (tebuconazole), en dosis de 2 $ml.L^{-1}$ para evitar el ataque de hongos del suelo (11). Estas yemas son colocadas en bandejas para su posterior germinación con sustrato compuesto por ceniza y cachaza (relación 3:1, respectivamente) y luego de 15 días son colocadas en una cámara de termoterapia durante 21 días a una temperatura de 40º C y 12 horas luz (12).

No obstante, de acuerdo con Castillo, *et al* (3); los tratamientos con agua corrida durante 48 horas más agua caliente a 51º C son efectivos para la eliminación de la bacteria de la escaldadura foliar pero inefectivo para el control del virus de la hoja amarilla. De igual forma, el tratamiento anterior más la termoterapia tampoco resultaron eficaces como alternativas de limpieza viral (11).

1.5.4. Tratamiento químico (agentes antivirales)

Existen agentes antivirales probados en seres humanos, entre ellos; amentedina (Symmetrel), rimantidina (Flumadina), ribavirín (Virazole), trifluoridina (Viroptic), aciclovin (Zorivax), famciclovin (Famvir), ganciclovin (Cytovene), foscarnet (Foseavir), habiéndose utilizado con éxito en plantas. Este trabajo cita como ejemplo al Virazole como alternativa para la eliminación del virus de la hoja amarilla (22).

Varias investigaciones científicas han reportado el uso de **agentes antivirales** para la eliminación de algunos virus. Estos compuestos fueron inicialmente utilizados en humanos y animales, pero dado su amplio espectro se utilizaron luego para eliminar virus en plantas. Algunos autores realizaron ensayos en busca de la eliminación de virus mediante el uso del viricida Ribavirin en dosis de 10 - 75 $mg.L^{-1}$ en las variedades de caña de azúcar D 1135, M 13/18, M 168/33 y MB 09/72. El agente antiviral puede ser incluido en el medio de cultivo para la obtención de vitroplantas, aunque los resultados no fueron del todo efectivos (23, 24).

Ribavirin es una molécula que posee actividad antiviral cuya acción no ha sido completamente elucidada, aunque parece interferir con la síntesis de ADN y ARN; y consecuentemente con la síntesis de proteínas. Su acción resulta principalmente en un efecto virustático intracelular en virus sensibles a Ribavirín, aunque su mecanismo de acción puede variar dependiendo del virus (1).

1.5.5. Inducción de Resistencia Sistémica Adquirida (SAR)

Son conocidas las actividades de ciertas moléculas denominadas elicitores que actúan desencadenando respuestas de defensa en las plantas. Esta respuesta que incluye la activación de más de una vía bioquímica se denomina Resistencia Sistémica Adquirida, (SAR, por sus siglas en inglés). Existen muchas moléculas que actúan activando respuestas SAR; entre ellas, el más conocido es el ácido salicílico (AS), el cual induce la producción de proteínas PR (proteínas relacionadas con la patogenia), así como la activación de varias vías bioquímicas que incrementan la resistencia a las infecciones (15).

Los procesos de resistencia son iniciados como una reacción oxidativa en los tejidos, que culmina con una lesión necrótica localizada, y; seguidamente la protección sistémica SAR se distribuye gradualmente en toda la planta. Ante el ataque de un patógeno, la planta prontamente responde mediante la producción de formas reducidas de oxígeno con la acumulación de peróxido de hidrógeno que puede contrarrestar el ataque del patógeno. Sin embargo, también puede afectar a la planta, por lo que para evitar este daño, el metabolismo vegetal incrementa la síntesis de antioxidantes estratégicos, tales como ácido ascórbico, glutation y enzimas relacionadas (15).

El desarrollo de respuestas de defensa está asociado con varios mecanismos celulares, tales como la muerte celular programada (CPD, por sus siglas en inglés), aunque un poco diferente de la ocasionada por daños físicos o la provocada por compuestos tóxicos. Esta respuesta hipersensible genera la acumulación de ácido salicílico (AS) en las células vecinas y la expresión de proteínas relacionadas con la defensa denominadas usualmente proteínas PR, entre las que se

encuentran las enzimas hidrolíticas, quitinasas, β-1,3 glucanasas, entre otras proteínas (2, 15).

Recientemente se han registrado trabajos en Banano, Tomate y Arroz, en los que se han empleado agentes inductores de la resistencia sistémica, entre los que se encuentran el Acido Salicílico, Acibenzolar-S-Methyl y compuestos elaborados con algunos microelementos, poliaminas y activadores de Ca^{+} – Calmodulina, como el Kit Releaf y otros. Estos han sido usados eficientemente contra la infección de bacterias, virus y hongos (5), observándose un incremento de la resistencia a la infección en las plantas estudiadas. Estos productos pueden ser una alternativa al manejo de la infección *ex vitro* del SCYLV en plántulas de caña de azúcar con el fin de garantizar una mayor sanidad de la semilla producida *in Vitro* (5).

En algunos ensayos de campo se encontró que la combinación del bacteriófago y el inductor de resistencia ASM (Acibenzolar -S- Methyl) mostró el mejor control contra la mancha bacterial en tomates (27); mientras que, según Momol *et al* (2004), en ensayos similares para el control de

TSWV (Tomato Spot Wilt Virus) observó que el ASM fue efectivo reduciendo la incidencia de la enfermedad (17, 29).

1.6. Técnicas utilizadas para el diagnóstico viral

Para certificar la sanidad de las vitroplantas obtenidas por estos sistemas es necesario contar con técnicas de diagnóstico rápidas, específicas y sensibles. Para la detección del virus de la hoja amarilla se emplea la técnica denominada Tissue Blot Immunoassay (TBIA) y DAS-ELISA (12, 30). Este diagnóstico se realiza antes de iniciar el proceso y durante las primeras etapas de multiplicación, así como en las evaluaciones periódicas en campo (3).

Así también, la técnica denominada RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) surge como una importante alternativa para el diagnóstico viral, que además posee una gran sensibilidad para la detección de ARNm viral (8).

Para el caso del SCYLV, las herramientas de diagnóstico más empleadas son la técnica molecular RT-PCR y la técnica inmunoenzimática TBIA (Tissue Blot Immunoassay), que consiste en el uso de una membraba de nitrocelulosa sobre la cual se imprime la porción de la nervadura central de la primera hoja con lígula visible

(TVD, Top Vissible Dewlap, por sus siglas en inglés) de cada uno de los tallos muestreados. Seguidamente, esta membrana es sometida al protocolo de TBIA (12).

Los diagnósticos con RT-PCR se efectúan utilizando los **primers ofM323 y ofM359** (US Sugar Corporation, Florida, USA) los cuales amplifican parte del genoma que codifica para la cápside del SCYLV. La RT-PCR se realiza en un termociclador en las siguientes condiciones: un ciclo; 94º C, un min; 54º C un min y 72º C 20 min, 40 ciclos; 94º C, un min; 54º C, un min y 72º C dos min y un paso final a 72º C por 10 min. Los productos de la RT-PCR son corridos en geles de electroforesis con agarosa al 1.8% (23, 24).

1.7. Objetivos

1.7.1. Objetivo general

Implementar un procedimiento efectivo de limpieza y manejo del virus SCYLV que permita el establecimiento de semilleros fundación de caña de azúcar (S*accharum officinarum*) de alta calidad fitosanitaria.

1.7.2. Objetivos específicos

1. Determinar la eficiencia del cultivo de meristemos y la inducción de callos embriogénicos en la eliminación del virus SCYLV.

2. Evaluar la eficiencia de la aplicación *In Vitro* del agente viricida Virazole (Rivavirín) y el inductor de SAR, Ácido Salicílico (AS), en la eliminación del virus SCYLV.

3. Establecer la eficiencia a nivel de campo de los inductores AS y un Kit Releaf (Stoller, Co), combinada con la aplicación de insecticida, en el control del virus SCYLV.

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Localización geográfica

La investigación se realizó en los laboratorios y en el lote 3 de los campos experimentales del Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador (CINCAE), ubicado en el Km 49.6 Vía Durán – Tambo, 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, con humedad relativa del 80.1% y a una altura de 60 msnm (20). Los trabajos se desarrollaron a partir de marzo del 2005 hasta septiembre del 2006.

2.2. Empleo de técnicas de cultivo de tejidos para la limpieza de SCYLV en la variedad CR74-250

2.2.1. Recolección de material enfermo

Este estudio se inició con la búsqueda de plantas infectadas con SCYLV. Se utilizó la variedad CR 74-250 que presenta una alta incidencia de infección por parte del virus en estudio. Las plantas utilizadas la investigación fueron aquellas que luego de un análisis mediante la técnica Tissue Blot Immunoassay (TBIA) resultaron positivas para este virus.

2.2.2. Obtención de semilla enferma, aplicación de tratamiento con agua caliente y siembra en bandejas.

Después del diagnóstico y conociendo las cepas enfermas con el SCYLV, los tallos fueron cortados para extraer las yemas usando una máquina extractora. Estas yemas se colocaron en agua recirculante durante 48 horas para estimular la germinación de las mismas. Luego de esto, las yemas se sometieron a un tratamiento con agua caliente, a 51° C durante una hora y posteriormente sumergirlas en el fungicida Folicur 250 EC (tebuconazole) en dosis de 2 $ml.L^{-1}$ durante cinco minutos.

Las yemas se sembraron en bandejas plásticas, con un sustrato compuesto por una mezcla de ceniza, cachaza y arena en proporción de 3:1:1, respectivamente. El material sembrado se colocó en un invernadero en completo aislamiento para generar el calor necesario que permita la germinación de las yemas.

2.2.3. Aplicación de la termoterapia

Una vez que las plántulas desarrollaron suficiente volumen de raíces y habiendo alcanzado una altura aproximada de 10 cm, se colocaron en la cámara de termoterapia que proporciona una temperatura de 41º C y 12 horas de fotoperíodo (Figura 2.1). En estas condiciones, las plantas permanecieron 15 días, durante el cual se les suministró agua por medio de riegos diarios para evitar que el sustrato alcance su punto de marchitez permanente.

A partir de estas plantas se extrajeron los meristemos, que fueron cultivados *In Vitro* de acuerdo con los tratamientos a ensayar.

Figura 2.1. Plántulas sometidas a termoterapia a 41° C durante 15 días. CINCAE, 2006.

2.2.4. Establecimiento en medio MS I y MS II

Estos meristemos se cultivaron *In Vitro* para la regeneración de plantas, utilizando el medio de cultivo I (MS I) (ver apéndices para la composición de los medios) o medio de establecimiento, colocado en condiciones de oscuridad durante 10 días. Los meristemos se colocaron en medio de cultivo fresco y puestos en agitación en una zaranda a 200 rpm durante un período de 30 días.

Luego de esto, los meristemos fueron transferidos al medio de multiplicación (MS II) durante 15 días con un fotoperíodo de

12 horas y una temperatura promedio de 25º C (Figura 2.2). Este medio es rico en citoquininas, lo que induce a la proliferación de tallos laterales. En esta investigación se efectuaron dos subcultivos que fueron sembrados en medio MS III para la formación de raíces y posterior endurecimiento bajo invernadero.

Figura 2.2. Crecimiento y multiplicación de plántulas meristemáticas. CINCAE, 2006.

2.2.5. Enraizamiento de plántulas en medio MS III

Para la fase de enraizamiento las plantas fueron transferidas al medio MSIII utilizando Kinetina y el ácido Indol Butírico, colocando cada macollo (tallo) al nuevo medio. En esta etapa

las plantas permanecieron por un período de 20 días, aproximadamente (Figura 2.3).

Figura 2.3. Desarrollo de raíces en medio líquido MS III. CINCAE, 2006.

2.2.6. Inducción de callos embriogénicos

Los callos embriogénicos fueron inducidos a partir de los meristemos extraídos de acuerdo a la metodología antes descrita, esto es; fueron sometidos a tratamientos de agua corrida, agua caliente, tratamiento fungicida y termoterapia. La porción central de cada explante se colocó en frascos de compota que contenían medio sólido enriquecido con 2,4 – D (2,4 - Diclorofenoxiacético) en concentraciones de 3 $mg.L^{-1}$ (apéndice A).

Los frascos sembrados se colocaron en la sala de incubación y se mantuvieron en penumbra por un período aproximado de 30 días, hasta observar la formación de una pequeña masa celular de color blanquecino y consistencia cremosa. A partir de entonces, los explantes fueron expuestos a la luz para que continúen su crecimiento, permaneciendo en estas condiciones por un lapso de 30 días más. Una vez establecidos y teniendo una masa celular de aproximadamente 1,5 cm de diámetro, los callos se colocaron en medios frescos y multiplicados a partir de éstos, completando un total de dos subcultivos (Figura 2.4).

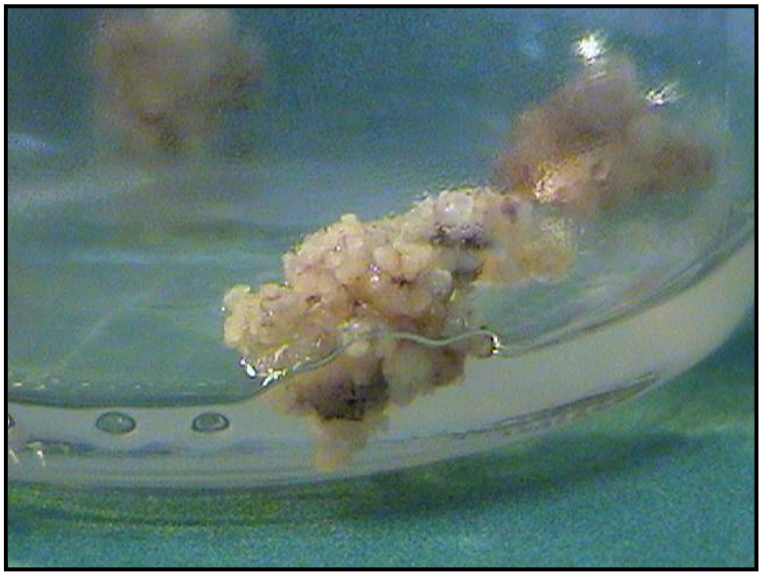


Figura 2.4. Inducción de callos en medio sólido enriquecido con 2,4-D. CINCAE, 2006.

2.2.7. Organogénesis indirecta a partir de callos embriogénicos

Para lograr la regeneración de plantas a partir de callos, éstos fueron colocados en un medio sólido carente de 2,4-D para su regeneración. A partir de los 25 a 30 días se observaron puntos verdes (Figura 2.5) y de 17 a 20 días los nuevos brotes estaban completamente diferenciados, completando un tiempo de 42 a 50 días en este medio (Figura 2.6).

Posterior a ello, los brotes completamente desarrollados y diferenciados fueron transferidos a medio líquido MSII para la obtención de brotes adicionales (Figura 2.7). En este medio, las plantas permanecieron por espacio de 20 días y finalmente se cultivaron en medio MS III para la inducción de raíces y su posterior endurecimiento bajo condiciones de invernadero.

Figura 2.5. Formación de puntos verdes a partir de callos embriogénicos en ausencia de 2,4-D. CINCAE, 2006.

Figura 2.6. Regeneración de plantas en medio sólido carente de 2,4-D. CINCAE, 2006.

Figura 2.7. Plantas regeneradas a partir de callos embriogénicos. CINCAE, 2006.

2.2.8. Aplicación de viricida y acido salicílico

Luego de someter las plantas a termoterapia y propagación *In Vitro* mediante cultivo de meristemos, se usó la molécula denominada Ribavirín (virazole), en concentraciones de 30 $mg.L^{-1}$, así como el ácido salicílico (AS) en concentraciones de 100 µM. Ambas sustancias fueron aplicadas al medio de cultivo en fase de multiplicación o MS II.

2.2.9. Factores y tratamientos en estudio de ensayo *In vitro*

El factor en estudio consistió en las técnicas de cutivo de tejidos para la eliminación del virus SCYLV. Los tratamientos en estudio fueron los siguientes:

Tabla 1. Descripción de los tratamientos en estudio de ensayo *In vitro*

Tratam. No	Codificación	Descripción
1	T1	Termoterapia + cult. de meristemos
2	T2	Termoterap. + cult. Meristem. + viricida Ribavirín
3	T3	Termoterapia + cult. de meristem. + SA
		Termoterapia + cult. Meristem + Callos
4	T4	Embriogénicos
5	T5	Termoterapia
6	T6	Control

En el primer tratamiento (T1), las plántulas fueron tratadas con termoterapia y luego se les extrajo el meristemo para propagarlas *In Vitro,* sembrándolas en medios de cultivo adecuados.

En el segundo tratamiento (T2), las plántulas fueron sometidas a termoterapia, posterior extracción del meristemo

y cultivadas *In Vitro,* para luego aplicarles el viricida Ribavirín (30 ppm) durante la fase de multiplicación en medio MS II.

En el tercer tratamiento (T3), las plántulas fueron sometidas a termoterapia, se extrajo el meristemo y una vez establecidas se aplicó el Ácido Salicílico (AS) en concentraciones de 100 μM en medio MS II.

El cuarto tratamiento (T4) consistió en la aplicación de termoterapia, extracción de meristemos y se indujo la formación de callos mediante el uso de medios de cultivo sólido conteniendo 2,4- D en dosis de 3 $mg.L^{-1}$.

En el quinto tratamiento (T5), las plántulas recibieron únicamente el tratamiento de termoterapia.

Finalmente, un sexto grupo de plantas (T6), no recibió ningún tratamiento y se mantuvieron bajo invernadero con aplicaciones periódicas de insecticida para evitar la presencia del insecto vector de la enfermedad. Estas plantas se utilizaron como control absoluto o testigo absoluto del ensayo.

2.2.10. Diseño experimental

Se utilizó un diseño en bloques completos al azar (DBCA) buscando la total homogeneidad en cada bloque.

2.2.10.1. Unidad experimental

Cada unidad experimental estuvo conformada por un grupo de 20 plántulas de la variedad CR74-250 obtenida a partir de yemas, cultivada en bandejas plásticas y sometidas a termoterapia. Posteriormente se extrajo el meristemo de cada una de ellas y se propagó mediante cultivo de tejidos.

2.2.10.2. Número de repeticiones y observaciones

Se colocaron 3 repeticiones para cada tratamiento. Se tomó un brote por cada explante obtenido *In Vitro* que fue cultivado en arena estéril para su endurecimiento bajo condiciones de invernadero, para luego determinar la presencia o ausencia del virus SCYLV.

2.2.10.3. Análisis de datos

Los datos fueron analizados mediante el uso del programa estadístico InfoStat, realizando el análisis de la varianza (ADEVA) respectivo para cada variable y la separación de medias mediante la prueba de Tukey, con un nivel de significancia del 5%.

2.2.11. Variables en estudio de ensayo de campo

Las variables en estudio fueron las siguientes:

2.2.11.1. Grado de fenolización.

Esta variable fue medida mediante el uso de una escala de acuerdo con el color del medio de cultivo, como sigue:

0 Nula oxidación (amarillo - blanco)

1 Baja (pardo - amarillo)

2 Media (pardo)

3 Alta (pardo - rojo)

2.2.11.2. Número de brotes por explante

Todos los explantes de cada uno de los tratamientos fueron evaluados mediante el conteo del número de brotes o tallos durante la fase de multiplicación en medio de cultivo MS II.

2.2.11.3. Incidencia del virus SCYLV.

La presencia o ausencia del virus en las muestras estudiadas se la llevó a cabo mediante la aplicación de la técnica inmunoenzimática Tissue Blot Immunoassay (TBIA), la cual consiste en la utilización de antisuero y conjugados enzimáticos diseñados para la detección específica del virus SCYLV. Para el efecto, se realizó una impresión de la nervadura de la primera hoja con lígula visible o TVD (Top Visible Dewlap) sobre una membrana de nitrocelulosa y posterior aplicación del protocolo respectivo.

2.3. Evaluación de inductores de resistencia sistémica adquirida (SAR) e insecticida para evitar la incidencia del virus de la hoja amarilla (SCYLV) en la variedad B7678, bajo condiciones de campo.

Además de los trabajos en laboratorio, el proyecto buscó controlar posibles reinfecciones a nivel de campo a causa de la presencia de insectos vectores de la enfermedad, particularmente *Melanaphis sacchari* Zehnt.

Para el efecto se estableció un ensayo de campo en el que se evaluaron los inductores de resistencia sistémica adquirida (SAR), a saber: Ácido salicílico (AS) y un kit comercial, denominado kit Releaf, el cual está compuesto por REZIST (Cu, Mn y Zn y poliaminas) más SETT (Ca, B, y un activador de Ca+ Calmodulina); además, del insecticida sistémico imidacloprid (Confidor 250SC), alternando con acefato (Orthene 75 PS).

2.3.1. Siembra del material vegetal en condiciones de campo

Para este caso se utilizaron plantas *In Vitro* de la variedad B76-78, la cual es muy preferida por *Melanaphis sacchari* Zehnt, vector del virus de la hoja amarilla (Figura 2.8). Esta es

una variedad comercial ampliamente cultivada, especialmente en el Ingenio Azucarero Valdez. El experimento se estableció en los terrenos experimentales del CINCAE (lote 3) y fue sembrado en septiembre del 2005, a partir de plántulas obtenidas *In Vitro* de esta variedad.

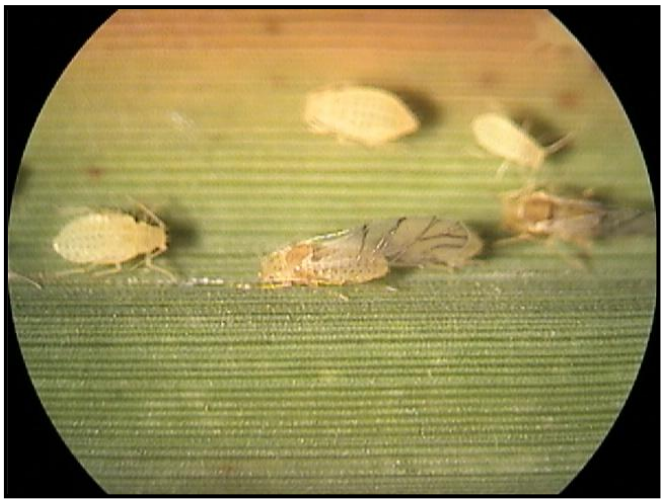


Figura 2.8. Especímenes ápteros y alados del áfido blanco, *Melanaphis sacchari* Zehnt.

2.3.2. Factores y tratamientos en estudio de ensayo de campo

Factor A: con tratamiento insecticida (a1) y sin tratamiento insecticida (a2).

Factor B: inductores de SAR:

Kit Releaf 0.8% (b1)

Kit Releaf 1.0 % (b2)

Kit Releaf 1.2 % (b3)

AS 0.5 mM (b4)

AS 1.0 mM (b5)

AS 1.5 mM (b6)

Control sin activador (b7)

Los tratamientos resultantes de la combinación de los niveles de cada factor fueron los siguientes:

Tabla 2. Descripción de los factores y tratamientos en estudio en ensayo de campo.

Tratamiento	Combinación de niveles	Factor A	Factor B
1	a1b1	Con insecticida	Kit releaf 0.8%
2	a1b2	Con insecticida	Kit Releaf 1.0%
3	a1b3	Con insecticida	Kit releaf 1.2%
4	a1b4	Con insecticida	SA 0.5 mM
5	a1b5	Con insecticida	SA 1.0 mM
6	a1b6	Con insecticida	SA 1.5 mM
7	a1b7	Con insecticida	Sin activador
8	a2b1	Sin insecticida	Kit releaf 0.8%
9	a2b2	Sin insecticida	Kit Releaf 1.0%
10	a2b3	Sin insecticida	Kit releaf 1.2%
11	a2b4	Sin insecticida	SA 0.5 mM
12	a2b5	Sin insecticida	SA 1.0 mM
13	a2b6	Sin insecticida	SA 1.5 mM
14	a2b7	Sin insecticida	Sin activador

Los inductores fueron aplicados 24 horas antes del trasplante y una semana después del mismo. Posterior a ello se realizaron aplicaciones mensuales hasta el quinto mes después del transplante.

La aplicación del insecticida también se efectuó cada 30 días, alternando los productos **imidacloprid,** en dosis de 1 $ml.L^{-1}$ y **acefato** en concentración de $3g.L^{-1}$.

2.3.3. Diseño experimental

Se utilizó un diseño de parcelas divididas (DPD) en donde la parcela grande correspondió a la aplicación del insecticida (con y sin insecticida); mientras que, las subparcelas, correspondieron a la aplicación de los inductores de SAR, con sus respectivas concentraciones. Entre cada bloque y alrededor del ensayo se cultivó caña de azúcar de la variedad B76-78 que se encontraba infectada por el virus de la hoja amarilla previo diagnóstico con TBIA. Esto con el fin de que sirva como fuente de inóculo de la enfermedad fortalecido con la liberación del insecto vector tal como se describió en el apartado anterior.

2.3.3.1. Unidad experimental y número de repeticiones

Cada unidad experimental estuvo conformada por cuatro hileras de cinco metros cada una. Se utilizaron 3 repeticiones para cada tratamiento.

2.3.3.2. Análisis de datos

Los datos fueron analizados mediante el uso del programa estadístico InfoStat realizando el análisis de la varianza (ADEVA) respectivo para cada variable y la separación de medias mediante la prueba de Duncan, con un nivel de significancia del 5%.

2.3.4. Variables en estudio de ensayo de campo

Las variables en estudio para el ensayo en condiciones de campo fueron las siguientes:

2.3.4.1. Incidencia del virus SCYLV.

Esta variable pudo ser medida aplicando la técnica inmunoenzimática TBIA, la cual ya fue descrita en el apartado anterior.

Los muestreos se efectuaron a los dos, cuatro y ocho meses después del transplante, tomándose la hoja TVD, la cual se sometió al diagnóstico mediante TBIA.

2.3.4.2. Producción de toneladas de caña por hectárea (TCH).

Esta variable fue medida a los 12 meses de edad del cultivo, mediante el peso de los tallos de cada unidad experimental.

2.3.4.3. Toneladas de azúcar por hectárea (TAH).

A los 12 meses, se registraron los datos de las toneladas de azúcar por hectárea (TAH) tomando muestras del jugo de los tallos de cada unidad experimental y llevadas al laboratorio de química del CINCAE para su posterior análisis.

2.3.4.4. Evaluación de la dinámica poblacional de *Melanaphis sacchari* Zehnt.

Mediante evaluaciones semanales se inspeccionó la dinámica poblacional del áfido blanco, *Melanaphis sacchari* Zehnt, efectuando una observación minuciosa

de todo el ensayo, en el que se registró el número de áfidos por planta y el número de colonias en cada tratamiento. Con estos datos se pudo elaborar un croquis que mostró la distribución del vector a través del tiempo y el espacio.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Empleo de técnicas de cultivo de tejidos para la limpieza de SCYLV en la variedad CR74-250

3.1.1. Aplicación de tratamiento con agua caliente

La aplicación de agua caliente a 51° C, durante una hora, dirigido a la semilla que se utilizó para la extracción de explantes, sigue siendo muy útil para evitar la contaminación endógena provocada por bacterias. No obstante, los resultados obtenidos confirman la ineficiencia de este tratamiento en la eliminación del virus SCYLV, mostrando una incidencia de la enfermedad del 90% (ver apartado 3.1.7).

3.1.2. Aplicación de termoterapia

Las plantas sembradas en bandejas y colocadas en las cámaras de termoterapia crecieron con dificultad, observándose además que sus hojas se secaron debido a la alta temperatura a la que fueron sometidas (41° C). No obstante, alrededor del 50% de las plantas (20 plantas) sobrevivieron al tratamiento para luego extraerles el meristemo.

Los resultados muestran que la variedad CR74-250 es sensible a las altas temperaturas, por lo que debe mantenerse en las cámaras por un lapso no mayor de 15 días; puesto que, tiempos mayores a éste significarían una pérdida considerable de las plantas que se están manipulando.

3.1.3. Establecimiento en medio MS I y MS II

Tal como se muestra en la Figura 9, los meristemos mostraron gran oxidación del medio de cultivo, particularmente cuando eran mantenidos en medio MS II, por lo que el lapso de tiempo ideal en que se deben hacer los

subcultivos es de 15 días para mantener un medio en buen estado, con escasa fenolización.

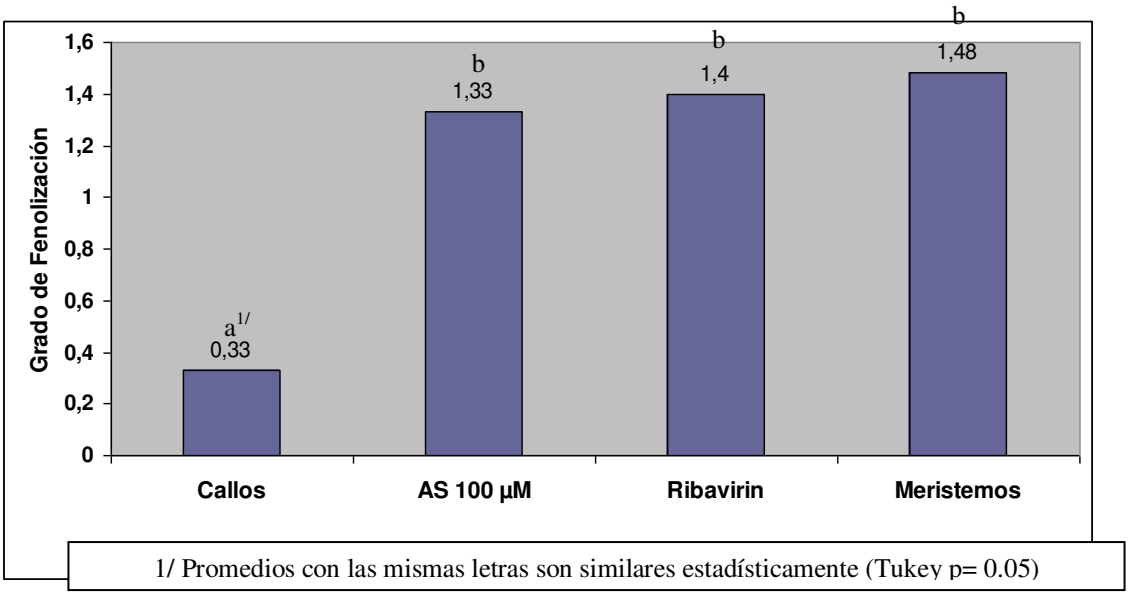
Cabe indicar que cuando se colocaron los brotes obtenidos por organogénesis (inducción de callos) indirecta en medio líquido MS II, éstos mostraron un bajo grado de fenolización, por lo que las plantas podrían mantenerse en este medio por más largo tiempo.

3.1.4. Acción del viricida Ribavirín

La actividad antiviral de Ribavirín potenciada con la extracción de meristemos en la limpieza de los explantes no condujo a una mayor eficacia en la obtención de plántulas libres del virus. Como se demuestra más adelante, mantuvo los mismos niveles de incidencia en los meristemos sin la aplicación del producto (apartado 3.1.7.). Esta ineficiencia se suma al mayor grado de fenolización observado en las plantas tratadas con el viricida. Esto indica que no es una alternativa promisoria en el combate del virus en condiciones de laboratorio.

3.1.5. Grado de fenolización

Los callos embriogénicos mostraron la menor producción de fenoles, de acuerdo a la coloración observada del medio de cultivo; mientras que, las plantas obtenidas a partir de meristemos y las tratadas con Ribavirín tuvieron los más altos niveles de fenolización. Por otra parte, el tratamiento AS 100 µM, tuvo un comportamiento intermedio a los anteriores tratamientos (Gráfico 3.1).



Graáfico 3.1. Grado de fenolización (escala de 0 a 3) en plantas *In Vitro* var. CR74-250. CINCAE, 2006.

3.1.6. Número de brotes por explante

La cuantificación del número de brotes por explante efectuada durante la fase de multiplicación mostró una producción de 6.4 brotes/explante en los callos embriogénicos; mientras que, los tratamientos Ribavirín, meristemos y AS 100 µM conforman un segundo grupo en cuanto al número de brotes producidos con 5.0, 5.3, y 5.3 brotes/explante, respectivamente (Gráfico 3.2), lo que muestra a los callos embriogénicos como una técnica eficiente para la producción de brotes laterales.

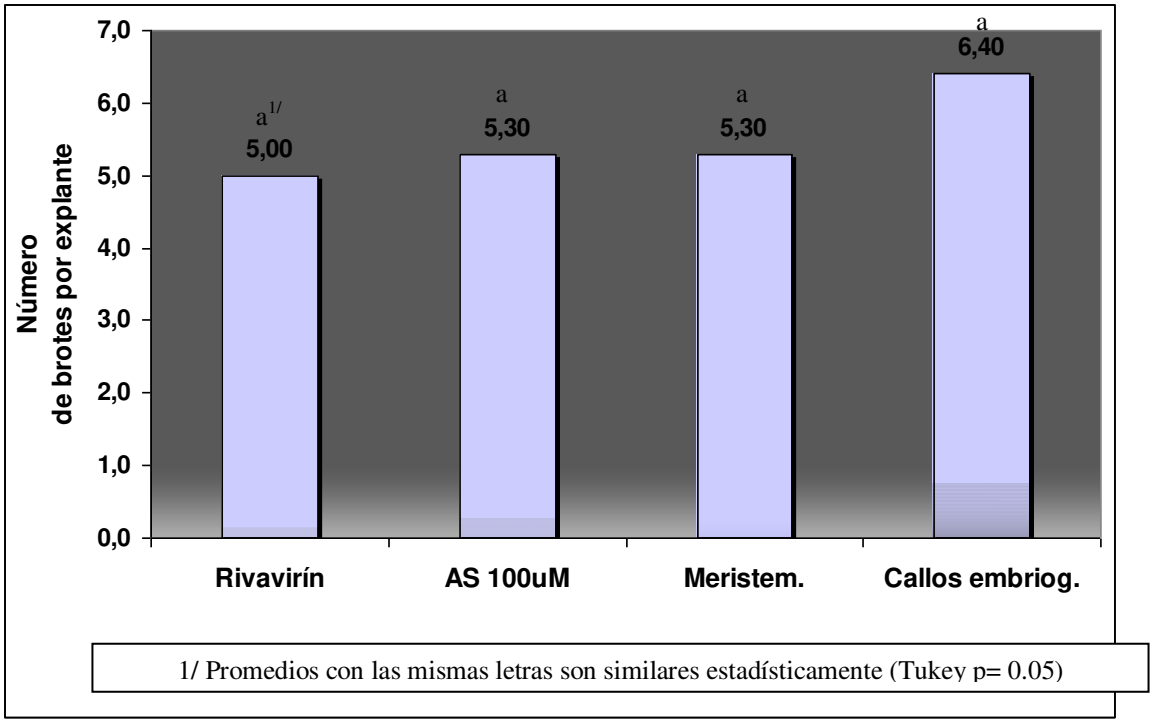


Gráfico 3.2. Número de brotes por explante en plantas *In Vitro* var. CR74-250. CINCAE, 2006.

3.1.7. Incidencia del virus SCYLV.

Los diagnósticos mediante TBIA, mostraron que los callos embriogénicos y la aplicación de AS 100µM, presentaron los más bajos niveles de incidencia, con 5% en ambos tratamientos; seguidos de los explantes sometidos solamente a la extracción de meristemos y los tratados con el viricida Rivavirín, con incidencias de 6.7% en los dos casos. Por otra parte, los controles con solo termoterapia y el testigo absoluto (tratamientos de agua caliente) mostraron incidencias del 86.7% y 90%, respectivamente (Gráfico 3.3). Además, no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos sometidos a la extracción de meristemos, inducción de callos embriogénicos, la aplicación de AS y Ribavirín.

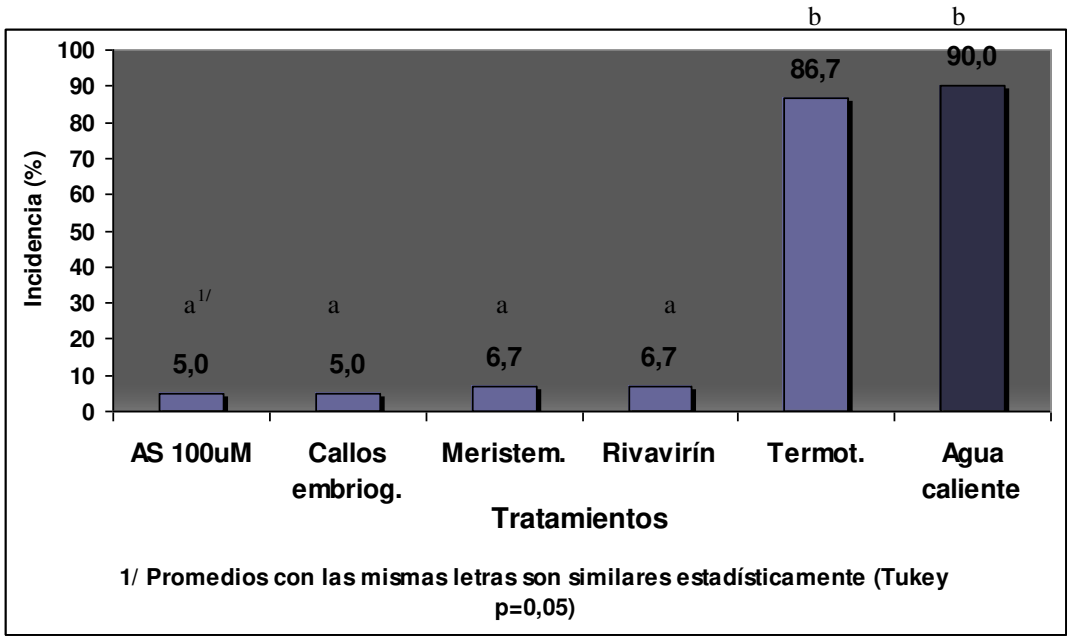


Gráfico 3.3. Incidencia del virus SCYLV en plantas de la var. CR74-250 tratadas in Vitro, con agua caliente y termoterapia. CINCAE, 2006.

3.2. Evaluación de inductores de resistencia sistémica adquirida (SAR) e insecticidas para evitar la incidencia del virus de la hoja amarilla (SCYLV) en la variedad B76-78, bajo condiciones de campo.

3.2.1. Incidencia del virus SCYLV en plantas colonizadas por *M. sacchari*

Al registrar el porcentaje de plantas colonizadas y el porcentaje de plantas infectadas por el virus en cada uno de los tratamientos, se pudo observar el efecto de los inductores de resistencia sistémica AS 1.5 mM y Kit Releaf 1.2%, comparados con el testigo sin inductor, al evitar la infección a pesar de la infestación por *M. sacchari,* lo que demuestra la eficiencia de estas moléculas activando los mecanismos de defensa de las plantas tratadas (Gráfico 3.4).

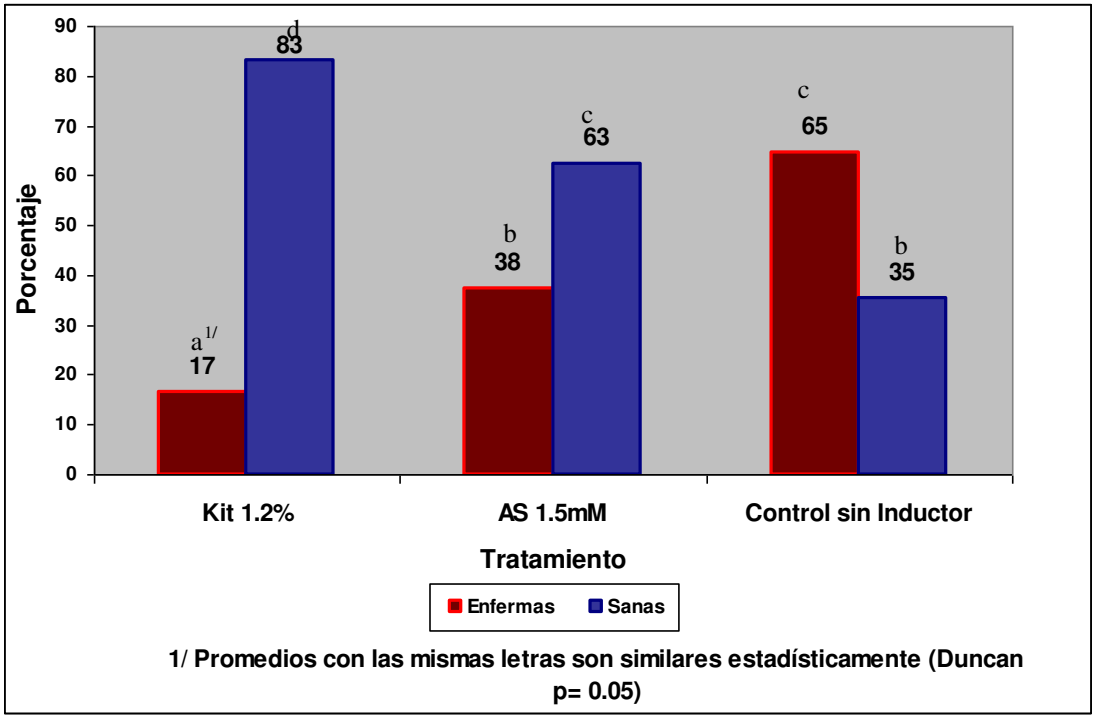


Gráfico 3.4. Porcentaje de plantas sanas e infectadas por SCYLV, colonizadas por *M. sacchari.* CINCAE, 2006.

Los datos obtenidos en este ensayo son similares a los mostrados por Figueredo, et al (10), al existir un comportamiento similar entre los valores máximos poblacionales del insecto y el progreso en la incidencia de la enfermedad. No obstante, aunque la población de áfidos haya bajado a causa de las lluvias, las plantas continuaron irreversiblemente infectadas por el virus en estudio (Gráfico 3.5).

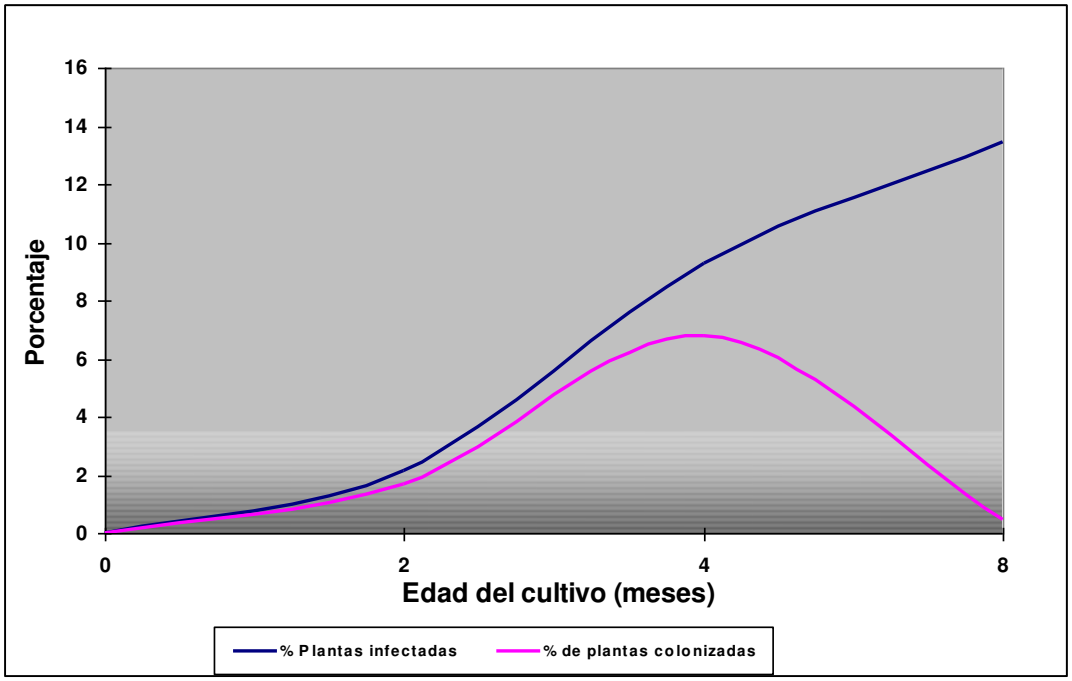


Gráfico 3.5. Fluctuación poblacional de *M. sacchari* e incremento de la incidencia del virus SCYLV. CINCAE, 2006.

3.2.2. Efecto simple de los inductores sobre la incidencia de SCYLV

A los dos meses de edad del cultivo, los tratamientos combinados del insecticida con el AS (1.5mM) y el kit Releaf (1.2% v/v), presentaron incidencias del 0% en ambos tratamientos, comparados con el testigo sin tratamiento que alcanzó 4.0% de incidencia (Gráfico 3.6). El análisis estadístico para esta variable muestra que existen diferencias

significativas al comparar el kit Releaf (1.2% v/v) con el tratamiento sin aplicación de inductores de resistencia; mientras que, los restantes tratamientos, comparten significancia estadística con los tratamientos antes mencionados (Gráfico 3.6).

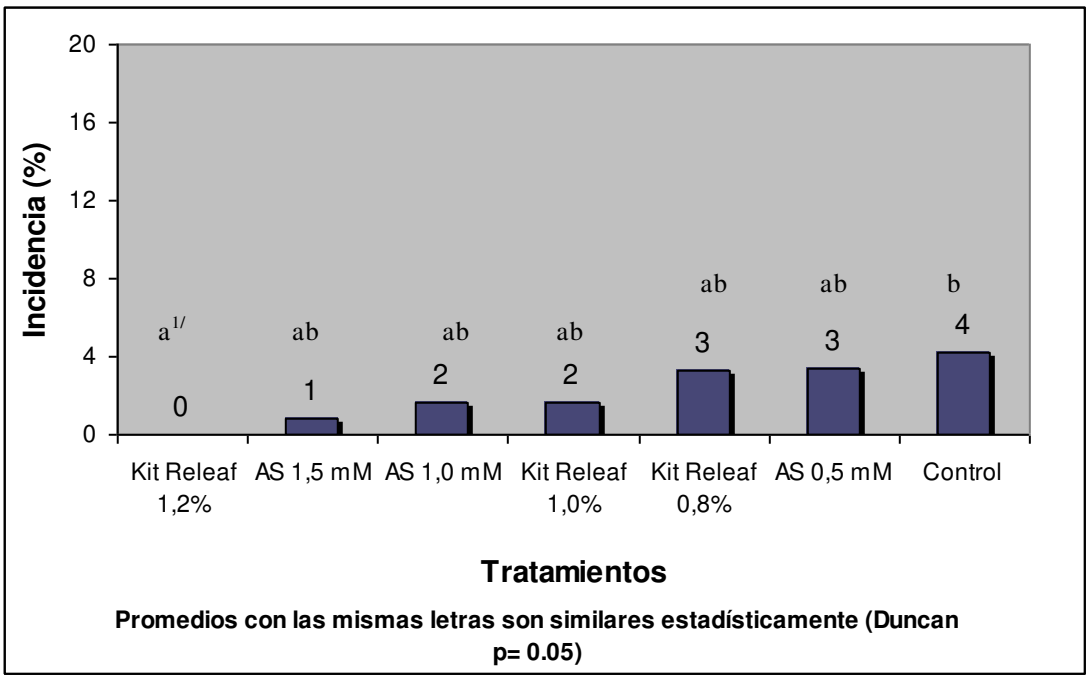


Gráfico 3.6. Incidencia de SCYLV a los dos meses de iniciado el cultivo en plantas de la variedad B76-78. CINCAE, 2006.

A los cuatro meses de edad del cultivo, los tratamientos con el AS (1.5mM) y el kit Releaf (1.2% v/v), presentaron incidencias del 3% y 2%, respectivamente, los cuales mostraron la misma significancia estadística. Al analizar los tratamientos

AS 1.0 mM, AS 0.5mM, Kit Releaf 1.0% y Kit Releaf 0.8% (v/v), se observó que tuvieron distinta significancia estadística a los dos anteriores pero iguales entre sí; mientras que, el testigo sin tratamiento mostró la más alta incidencia (17%), tanto numérica como estadística, comparada con los tratamientos anteriores (Gráfico 3.7).

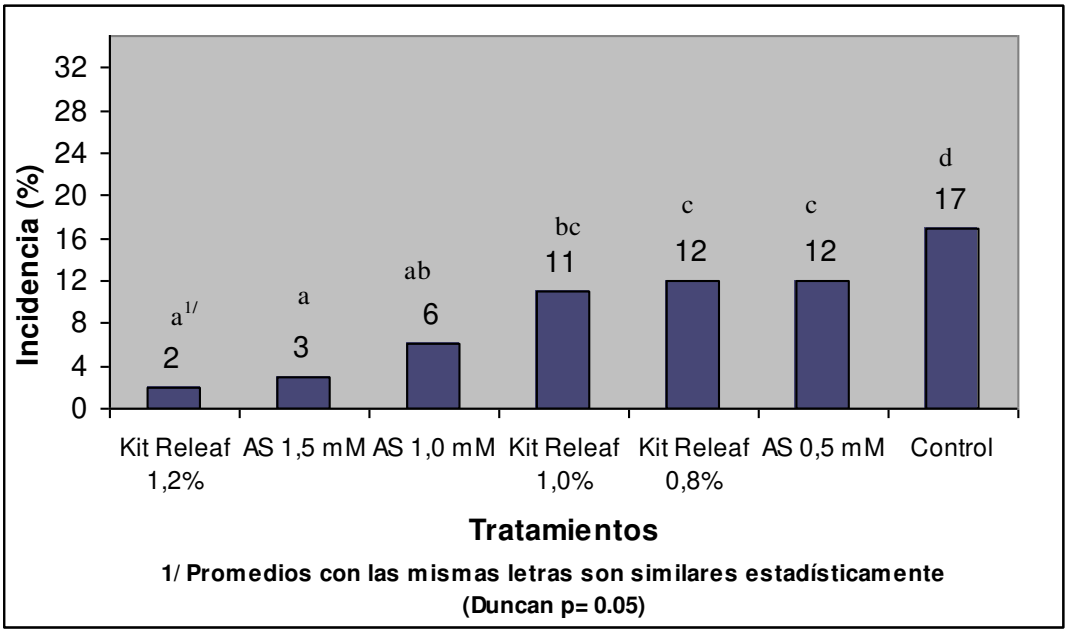


Gráfico 3.7. Incidencia de SCYLV, al cuarto mes después del transplante. CINCAE, 2006.

A los ocho meses, los niveles de incidencia aumentaron al 9% y 13%, en los tratamientos con las más concentraciones (Kit Releaf 1.2% y AS 1.5mM, respectivamente), comparado con el control sin inductor (33%). En todos los casos, la incidencia

fue mayor en los tratamientos sin la aplicación de insecticidas (Gráfico 3.8).

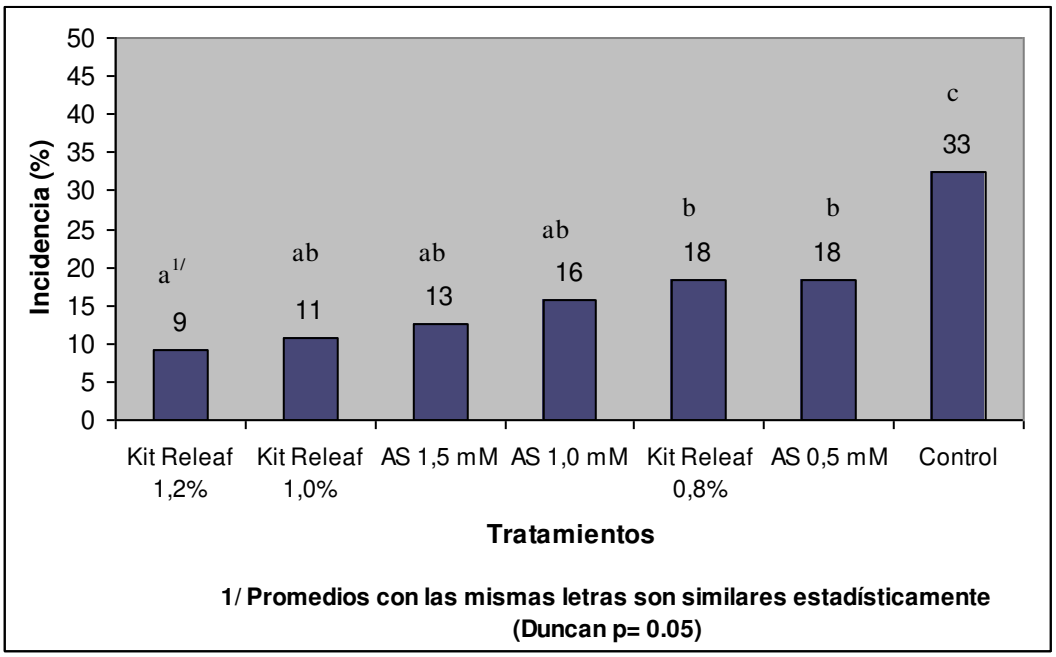


Gráfico 3.8. Incidencia de SCYLV a los ocho meses de edad del cultivo en plantas de la variedad B76-78. CINCAE, 2006.

3.2.3. Efecto simple de los insecticidas sobre la incidencia de SCYLV

En todos los bloques que recibieron tratamiento insecticida, tanto los niveles de infestación por *M. sacchari*, como los niveles de infección por el virus de la hoja amarilla, fueron menores. Así, en los lotes con tratamiento insecticida la incidencia del virus llegó al 14%, mientras que; en los bloques

sin insecticida el porcentaje de infección viral alcanzó el 19% al octavo mes de iniciado el cultivo (Gráfico 3.9).

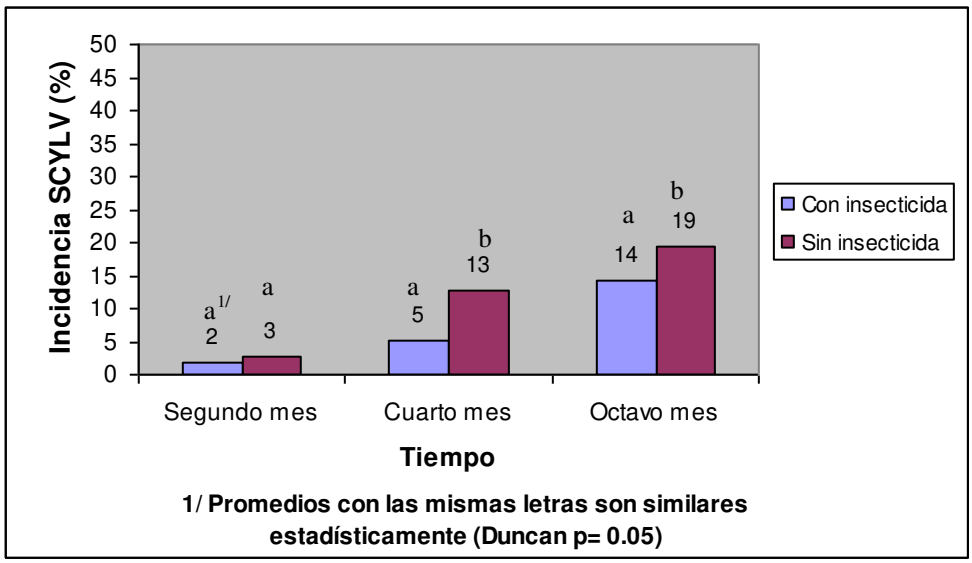


Gráfico 3.9. Efecto de la aplicación de insecticida sobre la incidencia del virus SCYLV. CINCAE, 2006.

3.2.4. Efecto en el tonelaje de caña cosechada

La producción de caña expresada en toneladas de caña por hectárea (TCH) fue mayor en las unidades experimentales con aplicación de los inductores de resistencia, alcanzándose 75 y 78 TCH en los tratamientos con el Kit Releaf 1.2% y AS 1.5 mM, respectivamente. El tonelaje más bajo se obtuvo en el control sin inductor con 61 TCH. Estos resultados muestran el efecto positivo del uso de los elicitores, evitando niveles

altos de incidencia del virus de la hoja amarilla. Además, confirman el efecto negativo de esta enfermedad en la producción de caña de azúcar (Gráfico 3.10).

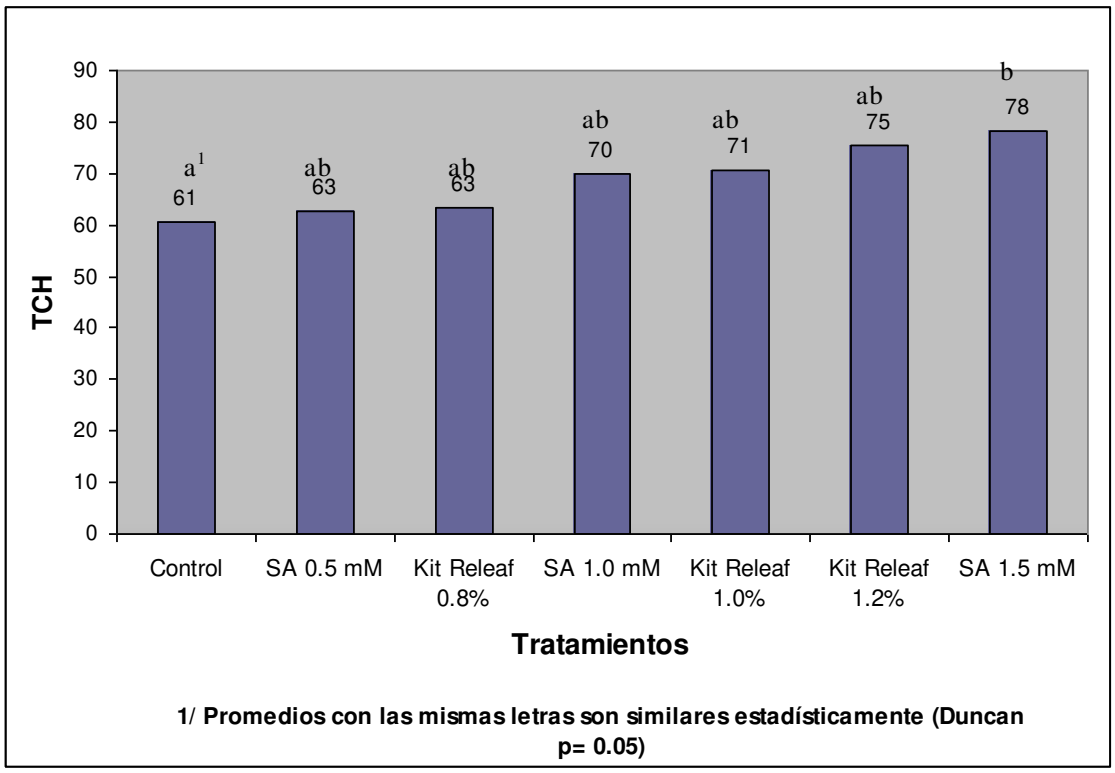


Gráfico 3.10. Efecto de los inductores de resistencia (SAR) en el tonelaje de caña por hectárea (TCH). CINCAE, 2006.

3.2.5. Efecto en el rendimiento azucarero (KATC)

Cuando se determinó el TCH y la calidad de los jugos (Kilogramos de azúcar por tonelada de caña, KATC), se evidenció que los tratamientos con AS (1.5 mM), AS (0.5 mM) y el Kit Releaf (1.2% v/v), presentaron los valores más altos de rendimiento azucarero con 112.01 KATC, 107.51 y 104.70, respectivamente; comparados con el testigo sin la aplicación de inductor, con 98.40 KATC. Estos resultados mostraron diferencias estadísticas significativas entre estos tratamientos (Gráfico 3.11).

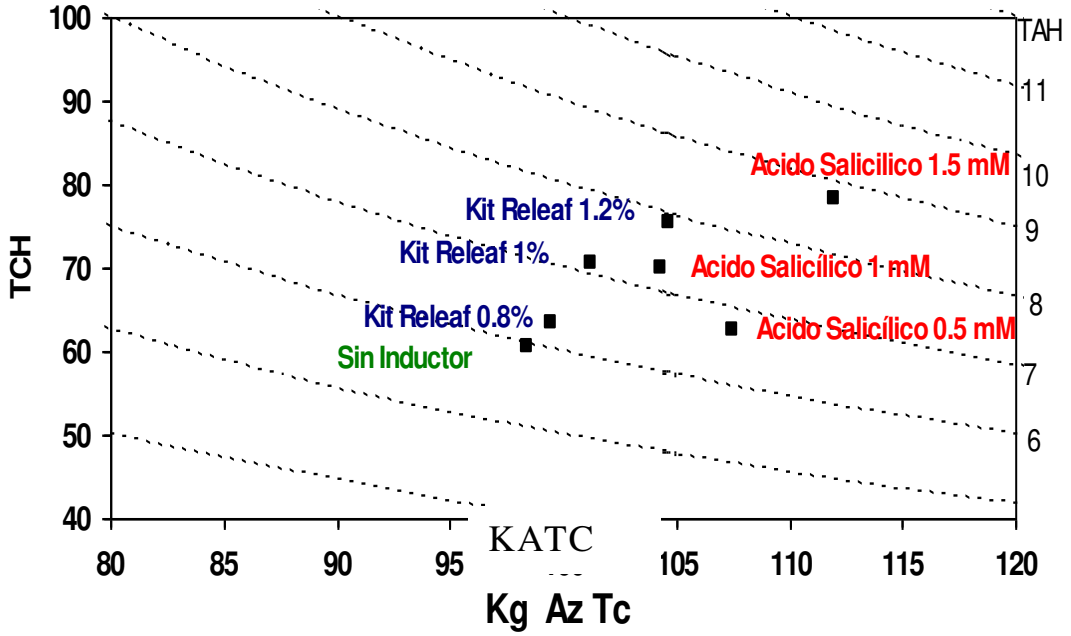


Gráfico 3.11. Curvas de isoproductividad mostrando el efecto indirecto de la aplicación de inductores de SAR, para prevenir la infección de SCYLV. CINCAE 2006.

3.2.6. Dinámica poblacional del áfido blanco Melanaphis sacchari Zehnt.

Se observó un aumento de la población de *M. sacchari* en la época seca, especialmente en noviembre, y luego decreció al iniciar la estación lluviosa. La distribución del áfido en el campo en las primeras evaluaciones fue aislada. Posteriormente la población de áfidos se incrementó mostrando hábito gregario, alcanzando en la semana ocho un promedio de 5.68 áfidos por planta. Estos resultados establecen claramente que la dinámica poblacional de *M. sacchari* está estrechamente relacionada con la presencia o ausencia de lluvias (Gráfico 3.12).

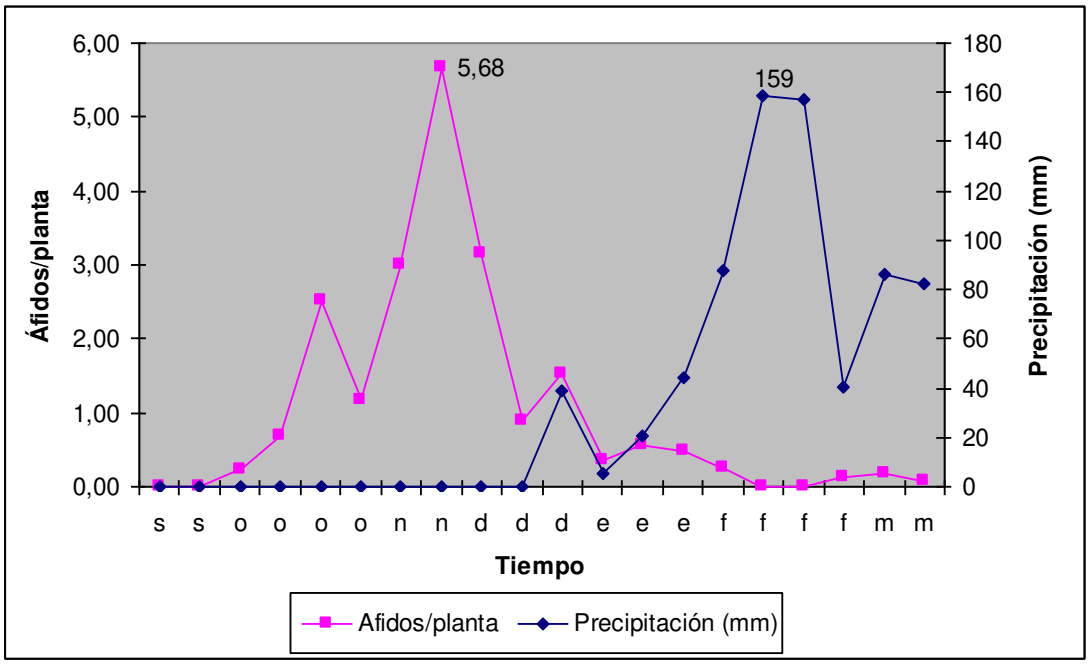


Gráfico 3.12. Relación entre la dinámica poblacional de *M. sacchari* y la precipitación pluvial. CINCAE, 2006.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES:

1. En este experimento se pudo corroborar la eficiencia de la extracción de meristemos en la indexación del virus, así como la ineficiencia de la termoterapia y el tratamiento con agua caliente para lograr la limpieza viral; mientras que, no hubo diferencias estadísticas al someter los explantes a la extracción de meristemos, inducción de callos embriogénicos y aplicación de los productos Ribavirín y AS.

2. Los meristemos y los callos embriogénicos, por su alta actividad mitótica y tejidos no diferenciados carentes de floema; impiden el ingreso del virus a esta región, por lo que al cultivarlos en medios de cultivo específicos se encontrarán libre de las partículas virales.

3. Por otra parte, la inducción de callos embriogénicos surge como una alternativa importante para la obtención de plantas libres de virus, sumado al mayor número de brotes por explante obtenidos y la menor producción de fenoles, lo que alarga la vida útil del medio de cultivo. Sin embargo, es importante tener en cuenta la posible variación somaclonal que podría generar la aplicación del regulador de crecimiento 2,4-D.

4. La protección de las plantas meristemáticas, con la combinación de insecticidas e inductores de resistencia sistémica adquirida (SAR), fue significativa, luego del diagnóstico realizado con TBIA (Tissue Blot Inmunoassay).

5. La aplicación de insecticidas sistémicos para evitar el incremento de las poblaciones del vector permite mantener incidencias bajas del virus SCYLV, en condiciones de campo.

6. Los tratamientos con los inductores SAR evitaron la infección viral y muestran un efecto positivo al permitir un incremento en el tonelaje de caña por hectárea (TCH), combinada con la aplicación de insecticidas.

7. De igual manera, los inductores de Resistencia Sistémica Adquirida permitieron obtener mayores rendimientos de azúcar (KATC),

particularmente si son combinados con la aplicación de insecticidas sistémicos.

RECOMENDACIONES:

1. Sobre la base de los resultados obtenidos, no se recomienda la utilización de las moléculas AS y Ribavirín como alternativas para la eliminación del virus de la hoja amarilla (SCYLV), puesto que existen respuestas muy similares a la extracción de meristemos e inducción de callos embriogénicos sin la aplicación de estas moléculas.

2. Hasta contar con variedades resistentes, una alternativa para prevenir la infección del SCYLV, consiste en la producción de semilla sana vía cultivo de meristemos y evitar la re-infección temprana de esta semilla en el campo.

3. Se recomienda realizar la siembra de caña de azúcar en diciembre para de esta forma escapar a las poblaciones del vector y por ende, a la infección viral. Por otro lado, si se realizan las siembras de plantas meristemáticas en Junio, se recomendaría aplicar los insecticidas imidacloprid (Confidor) y el acefato (Orthene), antes de la siembra y luego en el campo, de acuerdo a un adecuado monitoreo de las poblaciones del vector. Este criterio debe ir acompañado de una adecuada ubicación de

los semilleros alejados de fuentes de contaminación y un diagnóstico oportuno.

4. Aunque se observaron resultados promisorios, es necesario realizar otras evaluaciones en cuanto a frecuencias de aplicación de los inductores de resistencia sistémica, estabilidad de la resistencia y reacción de otras variedades, antes de su recomendación.

APÉNDICES

APÉNDICE A

COMPOSICIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA PROPAGACIÓN DE CAÑA DE AZÚCAR

Componentes *	**Dosis/Litro de medio de cultivo**		
	Establecimiento MS I	**Multiplicación MS II**	**Enraizamiento MS III**
Sales de Murashige & Skoog (g)	4.3	4.3	4.3
Reguladores:			
AG 3 mg)	0.1	-	-
BAP (mg)	-	0.2	-
KIN (mg)	0.1	0.1	0.1
ANA (mg)	-	-	5.0
Componentes orgánicos			
Tiamina – HCl (mg)	1.0	1.0	1.0
Mio – Inositol (mg)	100	100	100
Otros componentes			
Ácido cítrico (mg)	150	**-**	**-**
Sacarosa (g)	20	20	40
pH	5.7	5.7	5.7

*** Información proporcionada por A. Sanguino, COPERSUCAR – Brasil, 2001, citada por Castillo, et al. 2003.**

APÉNDICE B

COMPOSICIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA INDUCCIÓN DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS DE CAÑA DE AZÚCAR

Componentes* plantas a	Cultivo de callos		Regeneración de partir de callos.	
	MSC-CC	MSC-9	MSC-CCR_1	MSC-CCR_2
Agua de coco ($ml.l^{-1}$)	150	50	50	50
Arginina ($mg.l^{-1}$)	---	50	---	50
Caseina hidrolizada ($mg.l^{-1}$)	---	400	---	400
2.4 – D ($mg.l^{-1}$)	3	3	---	---
Sucrosa ($g.l^{-1}$)	30	30	20	20
Tiamina ($ml.l^{-1}$)	1	1	1	1
Agar ($g.l^{-1}$)	8	8	8	8

MSC-CC y MSC-9: medios para la inducción de callos embriogénicos.
MSC-CCR_1 y MSC-CCR_2 : Medios para la regeneración de callos embriogénicos.

***Información proporcionada por CENICAÑA, 1997**

APÉNDICE C

ANÁLISIS DE VARIANCIA DE LA INCIDENCIA DEL VIRUS SCYLV SOBRE VARIAS TÉCNICAS DE CULTIVO *IN VITRO*. CINCAE, 2006.

F.V.	gl	SC	CM	F	p-valor
Modelo	5	27790.28	5558.06	166.74	<0.0001
Tratamiento	5	27790.28	5558.06	166.74	<0.0001
Error	12	400.00	33.33		
Total	17	28190.28			

CV: 17.18

APÉNDICE D

ANÁLISIS DE VARIANZA DEL GRADO DE FENOLIZACIÓN EN MEDIO DE CULTIVO MS II. CINCAE, 2006.

F.V.	gl	SC	CM	F	p-valor
Modelo	5	4.15	0.83	22.45	<0.0001
Tratamiento	5	4.15	0.83	22.45	<0.0001
Error	12	0.44	0.04		
Total	17	4.59			

CV: 16.24

APÉNDICE E

ANÁLISIS DE VARIANZA DEL NÚMERO DE BROTES EN MEDIO DE CULTIVO MS II. CINCAE, 2006.

F.V.	gl	SC	CM	F	p-valor
Modelo	5	5.63	1.13	3.99	<0.0001
Tratamiento	5	5.63	1.13	3.99	<0.0001
Error	12	3.39	0.28		
Total	17	9.02			

CV: 9.43

APÉNDICE F

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA INCIDENCIA DEL VIRUS EN CONDICIONES DE CAMPO A LOS DOS MESES DE EDAD. CINCAE, 2006.

F.V.	gl	SC	CM	F	p-valor
Modelo	13	3.46	0.27	1.15	0.3638
A	1	0.29	0.29	1.25	0.2731
B	6	2.66	0.44	1.91	0.1135
A*B	6	0.51	0.08	0.37	0.8943
Error	28	6.49	0.23		
Total	41	9.96			

CV: 18.33

APÉNDICE G

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA INCIDENCIA DEL VIRUS A LOS CUATRO MESES DE EDAD. CINCAE, 2006.

FV	gl	SC	CM	F	p-valor
Modelo	17	62.63	3.68	7.07	< 0.0001
A	1	18.78	18.78	36.04	< 0.0001
Rep	2	0.36	0.18	0.34	0.7120
B	6	38.32	6.39	12.26	< 0.0001
A*B	6	1.78	0.3	0.57	0.7505
Error	24	12.5	0.52		
Total	41	75.14			

CV: 26.11

APÉNDICE H

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA INCIDENCIA DEL VIRUS A LOS OCHO MESES DE EDAD. CINCAE, 2006.

FV	gl	SC	CM	F	p-valor
Modelo	17	42.17	2.48	3.83	< 0.0014
A	1	4.84	4.82	7.43	< 0.0118
Rep	2	3.52	1.76	2.71	0.0867
B	6	29.83	4.97	7.67	0.0001
A*B	6	3.36	0.56	0.86	0.5350
Error	24	15.56	0.65		
Total	41	57.73			

CV: 20.19

APÉNDICE I

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LAS TONELADAS DE CAÑA POR HECTÁREA (TCH). CINCAE, 2006.

FV	gl	SC	CM	F	p-valor
Modelo	17	6760.86	397.70	2.65	0.0143
A	1	2166.35	2166.35	14.42	0.0009
Rep	2	1150.00	575.00	3.83	0.0361
B	6	1646.99	274.50	1.83	0.1360
A*B	6	1442.89	240.48	1.60	0.1902
Error	24	3605.24	150.22		
Total	41	10366.10			

CV: 17.85

BIBLIOGRAFÍA

1. AIDSINFO. 2004. Ribavirín. Hoja de datos técnicos (en línea). Consultado 15 may. 2005. Disponible en http://aidsinfo.nih.gov.

2. BAKSHA, R.; ALAM, R.; KARIM, M.; PAUL, S.; HOSSAIN, M.; MIAH, M.; RAHMAN, A. 2002. In Vitro Shoot Tip Culture of Sugarcane (*Saccharum officinarum*) Variety Isd 28 (en línea). Biotechnology, Volume 1 number 2-4: 67-72. Consultado el 28 may. 2005. Disponible en www.ansinet.org/fulltext/biotech/biotech1267-72.pdf.

3. CASTILLO, R.; GOMEZ, A.; GARCÉS, F. 2003. Multiplicación masiva de semilla sana en variedades de caña de azúcar mediante cultivo de tejidos vegetales. Publicación Técnica No 1. CINCAE. El Triunfo, Ecuador. 10 p.

4. CHATENET, M,; DELAGE, C.; RIPOLLES, M.; LOCKHART, B.; ROTT, P. 2001. Detection of Sugarcane Yellow Leaf Virus in Quarentine and Producction of Virus-free Sugarcane by Apical Meristem Culture (en

línea) Plant Diseases 85:1177-1180. Consultado 26 agost. 2005. Disponible en http://apsnet.org/pd/pdfs/2001/0830-01R.pdf.

5. CSINOS, A.; PAPPU, H.; MCPHERSON, R.; STEPHENSON, M. 2005. Management of Tomato spotted wilt virus in Flue-Cured Tobacco with Acibenzolar-S-Methyl and Imidacloprid (en línea). Consultado 01 dic. 2005. disponible en www.apsnet.org/pd/+toc/2005/dse05tc.htm.

6. COMSTOCK, J.C.; MILLER, J. D. 2001. Yield Comparisons: Disease-Free Tissue-Culture Versus Bud-Propagated Sugarcane Plants and Healthy Versus Yellow Leaf Infected Plants (en línea). Consultado 06 mar 2005. Disponible en www.asct.org/journal/JASSCT%20Files/vol24.

7. COMSTOCK, J.; R. A. GILBERT, A. 2001. Sugarcane Yellow Leaf Disease (en línea). Consultado el 23 may 2006. Disponible en edis.ifas.ufl.edu/SC074.

8. DHARMARAJ, S. 2003. TR-PCR. The Basics (en línea). Ambion. The RNA Company. Consultado el 14 agt 2005. Disponible en www.ambion.com/techib/baics/rtpcr.

9. EDON, C.; VAILLANT, J.; SAUVION, N. ; DAUGROIS, J., 2006. Spatiotemporal Evolution of Plant Infection by SCYLV in a Disease Free Plot. Toward Modeling Virus Spread in Tropical Condition. In VIIIth ISSCT Pathology Workshop Petit-Bourg, Guadaloupe, Fr. p. 41.

10. FIGUEREDO, L. ; HERNANDEZ, L. ; LINARES, B. 2004. Relación epidemiológica entre áfidos (homóptera : afididae) y enfermedades virales en el cultivo de caña de azúcar en los valles de los ríos Turbio y Varacuy, Venezuela. Caña de Azúcar Vol. 22(01) : 5-19. 2004 (en línea). Consultado 20 de marzo 2007. disponible en www.ceniap.gov.ve/pbd/RevistasCientificas/canadeazucar/cana2201/arti/figueredo.htm.

11. GARCÉS, F. ET AL. 2006. Procedimiento y recomendaciones técnicas para la producción de semilla sana libre de enfermedades. Informe semestral CINCAE, Julio 2006.

12. GARCES, F. ; VALLADARES, C. 2003. Diagnóstico serológico y molecular del virus del síndrome de la hoja amarilla (SCYLV), y las bacterias causantes del raquitismo de la soca *Leifsonia xyli* y la escaldadura de la hoja *Xantomonas albilineans*. Carta Informativa Año No 6 No1. Ene. Feb. 2004. CINCAE.

13. GARCÉS, F.; CASTRO, D.; FIALLOS, F. 2006. Control Químico del Mal de Piña, *Ceratocystis paradoxa* Dade, de la caña de azúcar. Carta informativa Año 8. No 1. En. – Mar. 2006. CINCAE.

14. GARCÉS, F.; ORELLANA, E.; MEDINA, R. 2004. Estudio de la transmisión del virus del síndrome de la hoja amarilla (SCYLV) y del virus del mosaico (SCMV) por insectos en caña de azúcar del Ecuador. Carta informativa Año 6. No 4. Jul. – Agost. 2004. CINCAE.

15. GOZZO, F. 2004. Systemic Acquired Resistance in Crop Protection (en línea). Outlooks on Pest Management 10.1564 Consultado 2 jun. 2005. Disponible en www.researchinformation.co.uk/pest/sample/15-1/11-Gozzo.pdf.

16. MCALLISTER, C.; HOY W.; REAGAN T. 2006. Temporal Increase and Spatial Distribution of Yellow Leaf and Sugarcane Aphid Infestation. In VIIIth ISSCT pathology Workshop Petit-Bourg, Guadaloupe Fr. p. 40.

17. MOMOL, M.; OLSON, S.; FUNDERBURK, J.; STAVISKY, J. 2004. Integrated Management of Tomato Spotted Wilt on Field-Grown

Tomatoes (en línea). Plant Diseases 88:882-890.Consultado el 06 jul. 2005. Disponible en 199.86.26.56/pd/pdfs/2004/0608-01R.pdf.

18. MOSELLA, CH.; ASCUI, M. 1991. Frutales libres de virus partiendo de ápices meristemáticos cultivados *in Vitro* (en línea). Consultado 16 de mayo de 2005. Disponible en www.ciat.cgiar.org/biotechnology/cultivo_tejidos/capitulo23.pdf

19. NEILL, S.; DESIKAN, R.; CLARKE, A.; HURST, R.; HANCOCK, J. 2002. Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide as Signaling Molecules in Plants. Journal of Experimental Botany. 53(372): 1237-1247.

20. ORELLANA, E. 2004. Estudio de la transmisión del virus de la hoja amarilla (SCYLV) por insectos en caña de azúcar. Tesis Mag. Sc. Guayaquil, Ec. Universidad de Guayaquil. 45 p.

21. ORTEGA, A. 2003. Diplomado en Protección de plantas. Cultivo in Vitro de células y tejidos vegetales. Guayaquil, Ec. 117 p.

22. ORTEGA, A. 2008. Cultivo de tejidos (entrevista). Guayaquil, Ec, ESPOL – CIBE.

23. PARMESSUR, Y.; ALJANABI, S.; SAUMTALLY, S.; DOOKUN-SAUMTALLY+. 2002. Sugarcane Yellow Leaf Virus and Sugarcane yellows Phytoplasma: Elimination by Tissue Culture (en línea). Plant Pathology 51, 561-566. Consultado el 09 marz. 2005. Disponible en http://ncb.intnet.mu/moa/farc/amas2001/pdf/s42.pdf#search=scbv%20saumtally.

24. PARMESSUR, Y. ; SAUMTALLY, A. 2001. Elimination of SugarcaneYellow Leaf Virus and Sugarcane Baciliform Virus by tissue culture (en línea). Consultado el 15 sep 2005. Disponible en http://ncb.intnet.mu/moa/farc/amas2001/pdf/s42.pdf#search=scbv%20saumtally.

25. PÉREZ, P. 1991. Cultivo de tejidos en la caña de azúcar In . Roca, W. y Mroginski, L. Eds. Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT Colombia. p. 543 – 575.

26. PIÑÓN, D.; ACEVEDO, R.; CARVAJAL, O.; LEÓN, O. 2003. Caracterización fisiopatológica de aislamientos del virus del mosaico de la caña de azúcar (en línea). Consultado 15 de agosto del 2005. Disponible en www.ceniap.gov.ve/bdigital/cana/cana1501/texto/fisiopatologia.htm

27. PRADHANANG, P.; MOMOL, P.; OLSON, S. 2005. Aplication of Acibenzolar-S-Methyl Enhances Host Resistance in Tomato Against *Ralstonia solanacearum* (en línea). Plant Disease DOI: 10.1094/PD-89-0989. Consultado 07 oct 2005. Disponible en www.apsnet.org/pd/+toc/2005/dse05tc.htm.

28. RIZZO, P. 2002. Agroinversiones. Entorno azucarero del Ecuador (en línea). Consultado 25 oct 2004. Disponible en www.sica.gov.ec/agronegocios/Biblioteca/Ing%20Rizzo/azucar.htm.

29. ROMERO, M.; KOUSIK, C.; RITCHIE D. 2001. Resistance to bacterial Spot in Bell Pepper Induced by Acibenzolar-S-Methyl. The American Phitopatological Society.

30. SCHENCK, S.; LEHRER, A.T.; WU, K.K. 2001. Yellow Leaf Sindrome (en línea) Hawaii Agriculture Research Center. Pathology Report 68. Consultado 02 jul 2005. Disponible en www.hawaiiag.org/harc/PATH67.pdf

31. VILLALOBOS, I; ARIAS, O. 2002. Inducción y multiplicación de callos *in vitro* en tres cultivares comerciales de caña de azúcar (*Sacchauum*

spp.) (en línea). Consultado 13 abr. 2005. Disponible en fbio.cu/files/pnac.pdf.