

MANEJO PREVENTIVO DEL RAQUITISMO DE LA SOCA (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*), ESCALDADURA DE LA HOJA (*Xanthomonas albilineans*) Y LA HOJA AMARILLA (*Sugarcane yellow leaf virus*, SCYLV) DE LA CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum spp.*) EN ECUADOR

Freddy Garcés, Fabián Fiallos, Jorge Mendoza, Edison Silva, Raúl Castillo, Mayra Valdez, Ignacio Viteri.

Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador, CINCAE- FIADE, Elizalde 114 y Malecón. Guayaquil, Ecuador.
Casilla letra "S". Estación Experimental: Km 49.5 vía Durán-Tambo,
El Triunfo-Guayas, Ecuador
fgarces@cincae.org

RESUMEN

El raquitismo de la soca (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*), la escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans*) y la hoja amarilla (*Sugarcane yellow leaf virus*, SCYLV-polerovirus), son las enfermedades sistémicas de mayor distribución e importancia en la zona de influencia de los ingenios San Carlos, Valdez y La Troncal del Ecuador. Desde los inicios del CINCAE, se planteó realizar un manejo preventivo de estas enfermedades sistémicas; para lo cual, se estableció un sistema cuarentenario para la importación segura de variedades, un esquema de producción de semilla sana, la desinfección de herramientas y un diagnóstico de estas tres enfermedades como criterio de selección de semilleros. Durante el proceso cuarentenario se ha detectado las tres enfermedades en el 33.5% de las variedades importadas, siendo la hoja amarilla (SCYLV) la más frecuente (60/215, 28.5%); 146 variedades de cuarentena pasaron por cultivo de meristemos *in vitro*, evitándose de esta forma el ingreso de éstos y otros patógenos, y posibles razas aún no presentes en Ecuador. El diagnóstico realizado al 100% de semilleros básicos y comerciales (2550 ha.año⁻¹ promedio), la producción masiva de semilla *in vitro* y yemas individuales empleadas para establecer 10.3 hectáreas promedio de semilleros fundación, el tratamiento térmico de semilla en los Ingenios, de variedades comerciales y clones promisorios, al igual que la desinfección de herramientas con amonio cuaternario (1%); han permitido reducir los niveles del raquitismo de la soca de un 41.7% a un 0.7% desde el año 1999 al 2012; la hoja amarilla de 36.4% a 9.6%; y la escaldadura por debajo del 1%, manteniéndose así por más de 9 años, aunque se hallan multiplicado variedades susceptibles. Adicionalmente, se han establecido metodologías de evaluación de resistencia a raquitismo y hoja amarilla para informar a los cultivadores sobre su manejo, e identificar clones y variedades resistentes, las cuales pueden ser usadas en los cruzamientos del programa de mejoramiento del CINCAE, o llegar a convertirse en futuras variedades.

Palabras claves: Cuarentena, semilla, manejo, diagnóstico, enfermedades, caña.

INTRODUCCION

Los problemas fitopatológicos sistémicos importantes presentes en los cultivos comerciales de caña de azúcar de los ingenios San Carlos, la Troncal y Valdez, ubicados en la costa ecuatoriana, son el raquitismo causado por la bacteria *Leifsonia xyli* subsp., *xyli* (*Lxx*), la hoja amarilla asociada con el virus SCYLV-polerovirus y la escaldadura de la hoja causada por la bacteria *Xanthomonas albilineans* (*Xa*) (Garcés *et al.*, 2005). Antes de la creación del CINCAE, el área de cultivo estaba sembrada con la variedad Ragnar en el 85%, siendo un riesgo epidemiológico para la industria, desconociéndose también la situación y manejo de los problemas asociados con enfermedades (Buenaventura, 1997; Garcés, 2000). La Ragnar sembrada actualmente en el 56% del área de los cañicultores de los ingenios (CINCAE, 2013), afortunadamente ha presentado resistencia a las principales enfermedades, entre ellas la escaldadura de la hoja (*Xa*), mosaico (SCMV-potyvirus), el carbón (*Sporisorium scitamineum*), la roya café (*Puccinia melanocephala*) (Garcés, 2003; Garcés, 2000) y la roya naranja (*Puccinia kuehnii*) (Garcés *et al.*, 2013). A pesar de este antecedente, que ha sido afortunado para la industria, existen pocas fuentes de resistencia a raquitismo (*Lxx*), escaldadura (*Xa*) y hoja amarilla (SCYLV), por lo que es necesario convivir y manejar de manera preventiva estos problemas, hasta contar con variedades resistentes o tolerantes (Victoria, 1996; Garcés, 2000).

Es importante que las variedades generadas por el CINCAE, presenten resistencia combinada a diferentes enfermedades. En este sentido no existen fuentes de resistencia genética para el raquitismo de la soca, por lo que rutinariamente se ha manejado desde los semilleros (Guillaspie *et al.*, 1989; Victoria *et al.*, 1995; Davis & Bailey, 2000). En los programas de mejoramiento de Australia como en Florida, se estableció una metodología de inoculación y de evaluación de resistencia al raquitismo, usando la técnica de TBIA, para evaluar la colonización vascular por la bacteria (Comstock *et al.*, 2001). De la misma forma para hoja amarilla en Colombia, Victoria *et al.*, (2005), definió una escala arbitraria de infección para separar variedades de acuerdo al nivel de incidencia en condiciones de invernadero, usando para su detección la TBIA; y en Florida, se realiza la evaluación de SCYLV desde el estado II al IV (Comstock *et al.*, 1999). Esta alternativa es importante evaluar, para entregarle a los cultivadores de caña, la mayor información posible, sobre la reacción de las variedades del CINCAE a enfermedades sistémicas como el raquitismo y la hoja amarilla. Desde los inicios del CINCAE, se planteó una serie de estrategias y medidas para prevenir estas enfermedades (Garcés, 2000), entre las que se encontraban el establecimiento de semilleros sanos, un proceso cuarentenario para caña de azúcar, la adopción de técnicas de diagnóstico, desinfección de herramientas, entre otras. El presente trabajo describe el establecimiento y resultados de un manejo preventivo de estas tres enfermedades sistémicas presentes en Ecuador, a través del CINCAE en 15 años de investigación y adaptación de tecnología.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cuarentena. Se estableció una cuarentena cerrada (invernadero de vidrio), ubicada en la Estación Experimental del Austro-INIAP (Km. 28 de la vía Cuenca – Gualaceo), a 2230 m.s.n.m. y más de 200 km de las zonas productoras de caña de azúcar; y una cuarentena abierta o post-entrada, actualmente localizada en la Hacienda el Alto en Cerecita. Todas las variedades que presentaron buenas condiciones sanitarias recibieron un tratamiento térmico corto que dependiendo del origen fue de 51°C por 30 minutos a 1 hora, y se sumergieron en una solución con el fungicida tebuconazole (Folicur 250 EC ®), e insecticida neonicotinoide (Thiamethoxam®, TMX). Con el ánimo de certificar la sanidad de las variedades presentes en cuarentena cerrada y abierta se colectaron muestras de hoja y tallo para diagnóstico. Las técnicas de diagnóstico usadas fueron inicialmente el DBIA (Dot blot inmunoassay) y la impresión de tejido en membrana de nitrocelulosa-ELISA o TBIA establecida por Shenck *et al.*, (1997) y modificada por Guzmán (2000) y Lehrer (2001), Nested-PCR o PCR anidado (Polymerase Chain Reaction) (Davis *et al.*, 1997) y RT-PCR (Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction) (Gómez *et al.*, sin publicar). En 2012 se estableció la técnica cuantitativa real time PCR o qPCR para el diagnóstico de raquitismo y escaldadura (Grisham *et al.*, 2007; Garcés *et al.*, 2013).

Producción de semilla sana. Se adaptó la metodología de producción de yemas individuales y de plantas meristemáticas, y el establecimiento de semilleros sanos, siguiendo las metodologías descritas por Buenaventura (1990); Victoria & Calderón (1995); Viveros *et al.*, (1997); Victoria *et al.*, (1999), y (Castillo *et al.*, 2003); se realizó la producción de plántulas de las variedades comerciales y de los clones promisorios del CINCAE. El material sembrado en los ingenios y CINCAE, permitió establecer los semilleros fundación y complementar lo que realizan los ingenios, de esta forma se fue incrementado para establecer los semilleros básicos y comerciales.

Tratamiento térmico y cultivo de meristemas. Con el ánimo de determinar el efecto del tratamiento térmico en el control del raquitismo y escaldadura; y del cultivo de meristemas en la eliminación de la hoja amarilla, se evaluaron diferentes tratamientos recomendados por Victoria *et al.* (1999), Rott *et al.*, (2000), Davis & Bailey (2000), y Chatenet *et al.*, (2001). Con la semilla sana, se estableció en campo un ensayo en el que se evaluó el efecto del virus de la hoja amarilla y del raquitismo en la producción, usando esquejes provenientes de semilla producida por cultivo de meristemas y contaminada con SCYLV y la bacteria *Lxx*.

Diagnóstico en semilleros. Una vez establecidas las técnicas de diagnóstico inmuno-enzimático en el 2000-2001 (Garcés *et al.*, 2003), siguiendo la metodología de Shenck *et al.*, (1997) y modificada por Guzmán (2000) y Lehrer (2001), se continuó ofreciendo un servicio de diagnóstico de enfermedades a los tres ingenios. Para ello, los departamentos de agronomía y siembra de los ingenios colectaron las muestras de hoja TVD (hoja con el último collarín visible) para el diagnóstico de la hoja amarilla, la TVD+3 (tercera hoja madura por debajo de la TVD) para escaldadura de la hoja, y del tercio basal del tallo para el diagnóstico del raquitismo de la soca. La cantidad de muestras que se colectó varió de acuerdo al área a evaluarse, tomando 20 hojas y tallos por cada 3 ha. de semillero (Victoria *et al.*, 1999), y con un mínimo

de 30 por muestra. Las hojas y tallos se mantuvieron frescas, hasta su arribo al laboratorio del CINCAE para su posterior procesamiento.

Desinfección de herramienta. Para seleccionar los productos desinfectantes presentes en el mercado, más efectivos y de menor riesgo, se realizó una evaluación *in vitro* de control. Las herramientas usadas fueron varillas de acero de 4.5 cm de longitud y 4 mm de diámetro, las cuales previamente se esterilizaron en autoclave antes de su inmersión en la suspensión bacteriana y desinfección en cada una de las concentraciones de los productos comerciales. La herramienta se mantuvo en la suspensión bacteriana por 10 segundos; posteriormente se retiró y se realizó una inmersión en la concentración a desinfectar (0, 0.5, 1, 2.5, 5%) por 5 segundos. Luego, se sembró en barrido sobre medio bacteriológico de Wilbrink cubriéndose un área rectangular de 36 cm²/caja petri y por triplicado. Se incubaron las cajas Petri a temperatura ambiente por 24 h., y para la lectura se dividió el área de siembra y se cuantificaron las unidades formadoras de colonia (UFC). Para determinar el tiempo mínimo de inmersión, en los desinfectantes más efectivos, se estimó en porcentaje de área cubierta con la UFC de *Xa*, por barrido de las varillas y la inoculación en medio Wilbrink previamente descritas.

Evaluación de resistencia a raquitismo y hoja amarilla. Cada una de las series del programa de mejoramiento se inoculó con jugo infectado con *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. Para la inoculación, al momento del corte de la semilla se sumergió el machete en jugo infectado extraído de tallos de la variedad Azul Casagrande. El jugo se mantuvo en hielo hasta terminar la inoculación, realizando la inmersión del machete cada dos cortes, bajo protección del UV. Para hoja amarilla se mantuvo durante todo el programa líneas inductoras del virus de la hoja amarilla (SCYLV), sembrando las variedades B76-78 y B74-132. En el estado IV se sembraron ensayos específicos para cada enfermedad en un diseño BCA con tres repeticiones. A los 11 meses de edad se tomaron al azar 10-15 hojas TVD por parcela, se llevaron al laboratorio y se efectuó el diagnóstico por TBIA para determinar la incidencia por parcela del SCYLV siguiendo la metodología descrita por Comstock *et al.*, (1999), y calificar los clones de acuerdo al nivel de infección planteado por Avellaneta (2002) y Victoria *et al.*, (2005). Para raquitismo, se cortaron cinco tallos por cada parcela y se llevaron al laboratorio para determinar mediante TBIA los vasos de xylema infectados, en una porción de tallo de aproximadamente 1 cm de diámetro (Harrilison & Davis, 1988). Con la información anterior se determinó el grado de reacción, de acuerdo a la escala propuesta por Comstock *et al.*, (2001, 2005), que va de 1 a 4; donde 1 es resistente y 4 susceptible.

RESULTADOS Y DISCUSION

Cuarentena de caña de azúcar para prevenir el ingreso de variantes y enfermedades exóticas.

El proceso de cuarentena establecido ha permitido importar un total de 215 variedades, provenientes de 11 países y 13 organizaciones, evitándose el ingreso de material asintomático infectado con escaldadura (*Xa*), raquitismo (*Lxx*) y hoja amarilla (SCYLV). En las 22 importaciones se han detectado diferentes enfermedades, siendo *Lxx*, *Xa* y SCYLV diagnosticadas en el 2.4, 1.4 y 28.6% de las variedades (Cuadro 1). Del total de variedades, el 33.5% resultó infectada con al menos una enfermedad, es decir, que el proceso cuarentenario permitió reducir el riesgo de introducir posibles variantes de escaldadura (Davis *et al.*, 1997; Champoiseau *et al.*, 2006), y de hoja amarilla (Moonan & Mirkov, 2000), al igual que de otras como el mosaico y el virus baciliforme (Datos no mostrados) (Rao *et al.*, 2013).

Cuadro 1. Diagnóstico del raquitismo, escaldadura y hoja amarilla en cuarentena cerrada. CINCAE, 2013.

Año de ingreso	Importacion	País de origen	Lugar	Número de variedades	Escaldadura	Raquitismo	Hoja Amarilla
2002	I	Brasil	CTC	10	0	0	5
	II	Colombia	Cenicaña	8	0	0	4
	III	USA	Colección mundial	31	1	1	11
2003	IV	USA	Colección mundial	30	2	0	8
	V	Brasil	CTC	25	0	0	12
	VI	Australia	BSES	5	0	0	2
	VII	Sur Africa	SASA	3	0	0	3
2004	VIII	USA	Colección mundial	3	0	0	2
2005	IX	Australia	BSES	4	0	0	0
	X	Cuba	INICA	18	0	0	3
2006	XI	Brasil	CTC	5	0	0	0
	XII	Mauricio	MSIRI	9	0	0	0
2007	XIII	Brasil	CTC	4	0	0	1
	XIV	Thailandia	MITR	9	0	0	0
	XV	USA	USDA-CP	10	0	0	1
2009	XVI	Australia	BSES	5	0	3	0
	XVII	Guatemala	Cengicaña	8	0	1	4
2011	XVIII	Guatemala	Cengicaña	6	0	0	0
	XIX	Francia	CIRAD	5	0	0	0
	XX	Australia	BSES	5	0	0	0
2012	XXI	Perú	Cartabio	7	0	0	4
	XXII	USA	LSU	5	-	-	-
Subtotal	22	11	13	215	3	5	60
Frecuencia de infección (%)					1,4	2,4	28,6

En una introducción reciente no se detectó el virus de la hoja amarilla durante el primer ciclo de caña planta en cuarentena cerrada; siendo detectado después del corte en cuarentena cerrada y en la caña planta emergida en cuarentena abierta; probablemente por una mayor expresión del virus en condiciones de cultivo y ambientes normales. Por esta razón, es importante continuar con el monitoreo de las variedades en cuarentena post-entrada o abierta esperando que se favorezca la expresión de síntomas o la multiplicación de patógenos que escapen el primer ciclo de cuarentena. No se evidenció síntomas asociados con enfermedades exóticas ni con las detectadas por las técnicas serológicas y moleculares,

presentándose las variedades importadas como asintomáticas. De ahí la importancia de contar con técnicas de diagnóstico específicas y sensibles que permitan detectar patógenos sistémicos. Similares resultados se observaron con SCYLV en Mauricio, donde el 32% de las variedades importadas presentaron el virus SCYLV en plantas asintomáticas (Joomun *et al.*, 2013). Un total de 146 variedades de cuarentena han pasado a través del proceso de limpieza por cultivo de meristemas, debido a infección con enfermedades presentes en Ecuador, o para variedades provenientes de zonas de riesgo como Australia y Tailandia (Cuadro 2). El sistema cuarentenario de la industria azucarera, es el primero de este tipo en el país, y es reconocido por el ministerio de agricultura, a través de AGROCALIDAD como punto de cuarentena para caña de azúcar. Al contar con un sistema cuarentenario seguro, acompañado de técnicas de diagnóstico específicas y sensibles; se ha asegurado la producción de la industria, y se ha mantenido la ventaja competitiva con otros países en los cuales se encuentran variantes de las enfermedades presentes y de otras enfermedades exóticas que han diezmando la producción. El sistema cuarentenario es un proyecto a término indefinido, el cual indirectamente le ha proporcionado seguridad a la población ecuatoriana cuyos empleos dependen directa e indirectamente, de la producción de azúcar, alcohol y panela en la costa y sierra.

Desinfección de herramientas. El mejor producto por su eficacia en la eliminación de la bacteria y por el bajo riesgo de uso, fue el amonio cuaternario (Obsiquad MC-AQ, 80%). De acuerdo al conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) realizado a las 24 horas después de la desinfección, se evidenció que todos los productos comerciales evaluados a diferentes concentraciones a excepción del yodo libre (Yonex ®, 10 g de I.A./l) fueron efectivos para eliminar la bacteria (Figura 1). El Yodoforo (Chadine ®, 2.5%), al igual que el hipoclorito de sodio (Clorox 5% de I.A.) y la Creolina (10%), eliminaron la bacteria a una concentración del 2.5% de producto comercial. En otro experimento se determinó los tiempos de inmersión, encontrándose que el amonio cuaternario al 1%, sólo con 5 segundos de contacto con el producto fue suficiente para eliminar la bacteria causante de la escaldadura de la hoja, *Xa* (Figura 2). Al comparar los productos en cuanto al riesgo a la salud, el ambiente y reactividad, el producto de menor riesgo fue el amonio cuaternario. Desde los inicios de multiplicación de semilla sana se ha recomendado desinfectar las superficies cortantes, como discos de las cultivadoras, de herramientas para el corte de semilla y cosecha, ya que permite evitar la transmisión mecánica de enfermedades como la escaldadura de la hoja y el raquitismo (Rott, 2000; Ricaud y Ryan, 1989; Guillaspie & Teakle, 1989). Esta última es transmitida eficientemente con la siembra y cosecha mecanizada, en Australia se transmitió en la Q26 hasta 60 cepas en línea; y con la cosecha mecánica el nivel de incidencia pasó de caña planta a soca de un 16% al 47% (Guillaspie & Teakle, 1989). Una situación similar se presentó en Ecuador en un lote de la

ECU-01 que pasó de 0% en el 2012 a un 25% de incidencia en el 2013, luego de ser cortado mecánicamente. Teniendo en cuenta que las variedades comerciales, incluyendo las liberadas por el CINCAE son susceptibles a raquitismo, y este es transmitido mecánicamente, es recomendable continuar realizando la desinfección de las herramientas antes y después de salir de un lote, tanto en la cosecha manual como mecánica, y así evitar contaminar lotes sanos establecidos. Una medida simple de desinfección puede asegurar la sanidad del lote a largo plazo y sostener la producción.

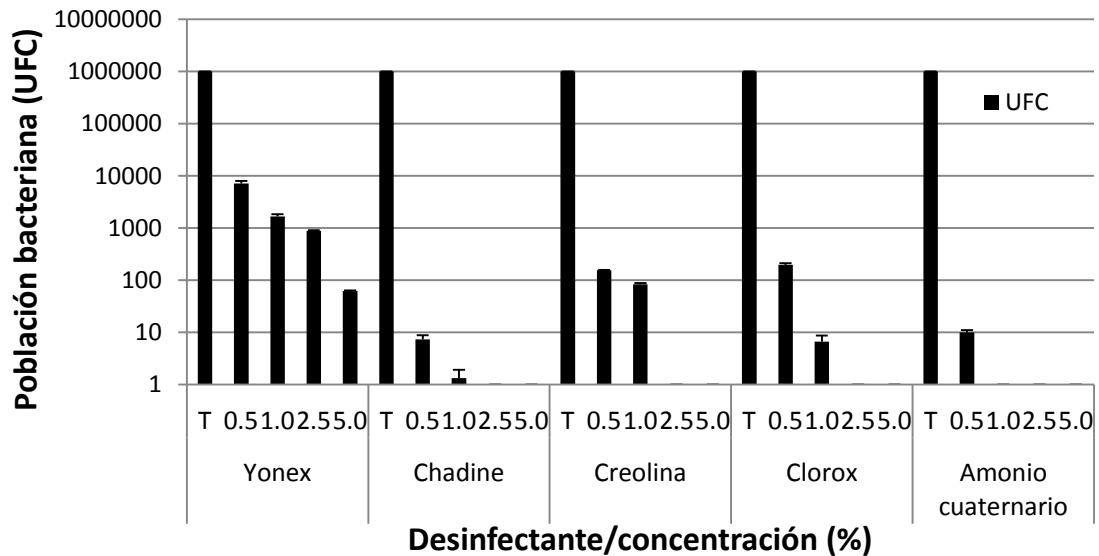


Figura 1. Población bacteriana presente en superficie, luego de desinfectar con diferentes productos y concentraciones. CINCAE, 2013

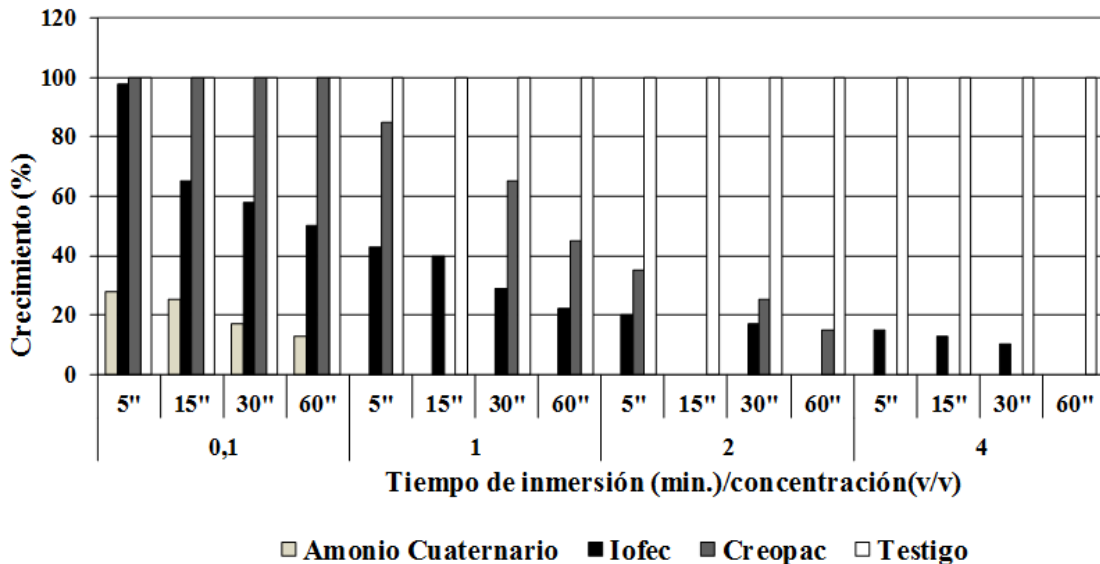


Figura 2. Población bacteriana en superficie, luego de desinfectar con diferentes tiempos de desinfección. CINCAE, 2002.

Tratamiento con agua caliente, termoterapia y cultivo de meristemos. Se eliminó la escaldadura y el raquitismo con el tratamiento térmico y se redujeron los niveles de infección del virus de la hoja amarilla mediante el cultivo de meristemos. El tratamiento de agua a temperatura ambiente (ATA) seguido de 51°C por 1 hora controló completamente el raquitismo en la variedad Azul Casagrande susceptible a raquitismo; mientras que, para escaldadura en la variedad CC85-92 empleando esquejes de 3-4 yemas, fue controlada con el tratamiento corto de 2 horas a 52°C (Figuras 3 y 4). Guevara *et al.*, (2005), evaluó la combinación de diferentes tratamientos térmicos incluyendo el cultivo de meristemos para eliminar escaldadura, raquitismo y hoja amarilla, encontrando que el nivel de incidencia de *Xa* paso de 80% en el testigo a 2%, para SCYLV del 78% al 19%, y para *Lxx* del 97% al 0%. El mismo autor indicó una posible infección aérea de *Xa* en el lote sembrado en el campo, que pudo explicar la infección observada. Victoria *et al.*, (1999), al comparar esquejes de tres yemas y yemas individuales; encontraron que para eliminar completamente la escaldadura de la hoja era necesario combinar el tratamiento térmico largo de yemas individuales con agua circulante a temperatura ambiente por 24 a 48 horas, seguido del tratamiento a 51°C por 1 hora. Con el ánimo de controlar efectivamente el raquitismo y la escaldadura, se decidió combinar el tratamiento térmico largo con la extracción de yemas individuales, el cual se realiza rutinariamente en el CINCAE para multiplicar clones promisorios y las variedades comerciales solicitadas por los ingenios. Por otro lado, cuando se compararon diferentes métodos de eliminación del SCYLV, se observó que ninguno de los tratamientos con calor por si solos, eliminó el virus; mientras que, la combinación de éstos con el cultivo de meristemos produjeron un 95% de plantas sanas (Figura 5). Fitch *et al.*, (2001), observó que es posible eliminar en un 100% el virus combinando la extracción del meristemo entre 0.3-0.7 mm con la organogénesis indirecta vía callos; de 10 variedades sólo una tuvo un 20% de infección; mientras que, en las demás se eliminó completamente. Siguiendo la generación de callos descrita por Cerón (2006), se obtuvieron callos friables y embriogénicos, de donde se regeneraron plantas completas. Sin embargo, al evaluar la presencia del virus, se detectó en el 5% de ellas.

El tratamiento combinado de las yemas con ATA circulante y agua caliente a 51°C por 1 hora, seguido de la termoterapia de las plántulas germinadas por 15-21 días con aire caliente a 41°C y cultivo de meristemos, permitió obtener un 95% de plantas sanas. Es

posible que al igual que lo observado por Victoria *et al.*, (1999), variaciones en el tamaño de los meristemos extraídos afectaron la eficiencia de eliminación del virus. En la variedad CR74-250 no se eliminó totalmente el SCYLV, por lo que para evitar un posible escape, se decidió establecer un invernadero con plantas madres, y previo diagnóstico iniciar el proceso a partir de semilla libre de las tres enfermedades.

Durante todo el proceso de multiplicación *in vitro* se han realizado modificaciones a los medios de cultivo, las que permitieron obtener un mayor establecimiento y supervivencia de meristemos, vigor de macollamiento, al igual que mejora en la inducción de enraizamiento. Hasta la fecha no se han observado diferencias fenotípicas o variaciones somaclonales al emplear el cultivo de meristemos en las variedades comerciales, lo que concuerda con Hoy *et al.*, (2003), quienes no tuvieron diferencias entre la semilla producida *in vitro* y la semilla proveniente de yemas.

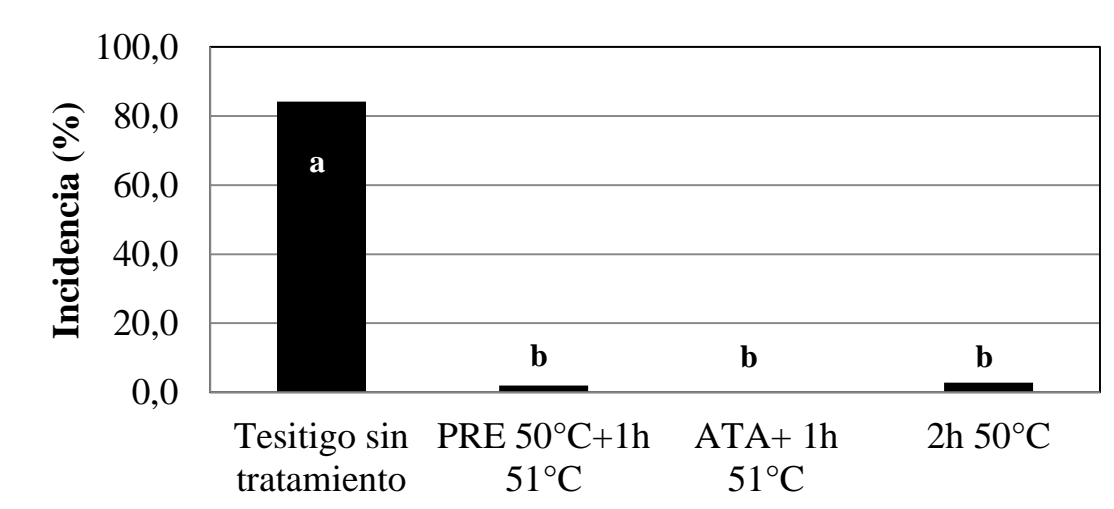


Figura 3. Control del raquitismo de la soca en la variedad Azul Casagrande con tres tipos de tratamiento con agua caliente. CINCAE, 2004. Promedios seguidos con una misma letra en cada columna son iguales estadísticamente, Duncan $P=0.05$.

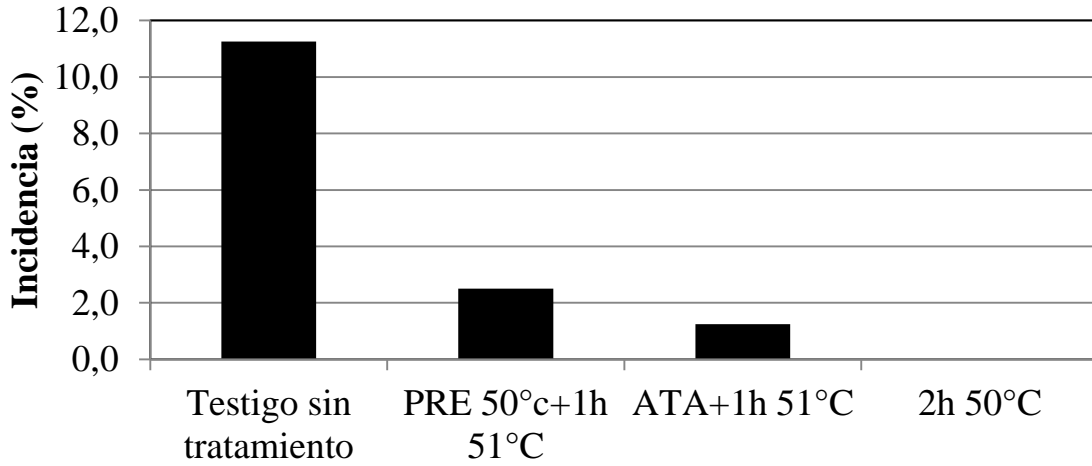


Figura 4. Control de la escaldadura de la hoja en la variedad CC85-92 con tres tipos de tratamiento con agua caliente, y su efecto en la germinación reflejado en el TCH. CINCAE, 2004

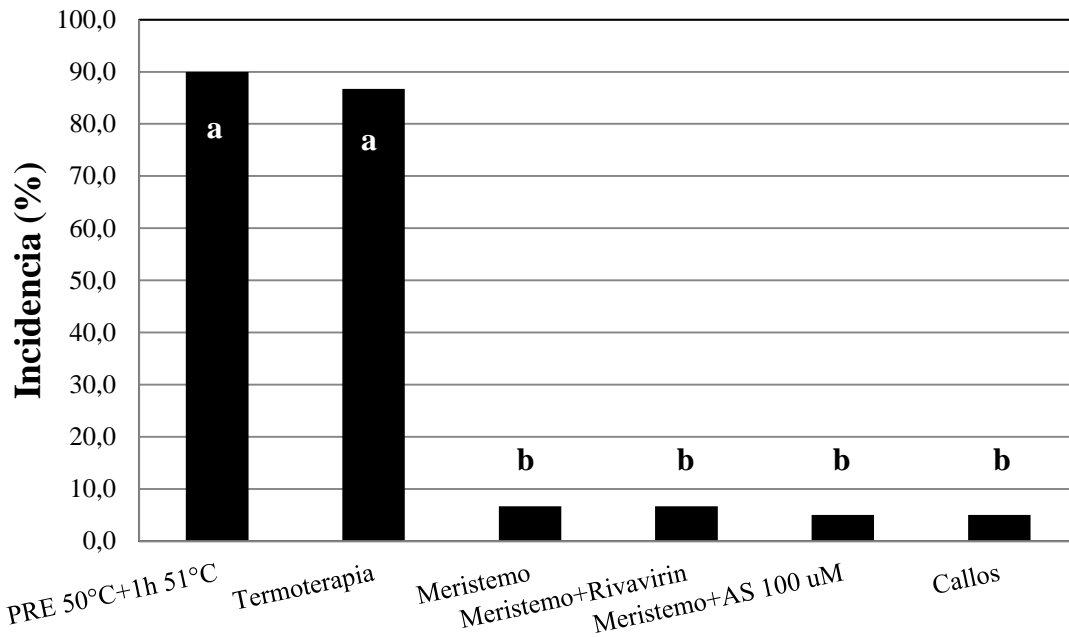


Figura 5. Control del virus de la hoja amarilla SCYLV en la variedad CR74-250, mediante tratamientos térmicos, cultivo de meristemos, organogénesis indirecta vía callos y tratamientos químicos. CINCAE, 2006. PRE=pretratamiento de 10 min., AS= Ácido salicílico. Promedios seguidos con una misma letra en cada columna son iguales estadísticamente, Tukey $P=0.05$.

Multiplicación masiva y limpieza de variedades/clones por cultivo de meristemas y tratamiento térmico de yemas. Desde el año 1998 hasta la fecha el CINCAE ha entregado a los ingenios semilla sana proveniente de cultivo de meristemas y/o multiplicada masivamente por el sistema de yemas individuales. Durante los años 1998-2013 de limpieza de semilla en el CINCAE, se ha producido un total de 1082424 plántulas. Durante los dos primeros años trató térmicamente yemas individuales de la variedad Ragnar, y a partir del 2003 se combinó la entrega de plántulas meristemáticas y provenientes de yemas. Un promedio de 28 variedades/clones ingresan a limpieza todos los años; siendo el 46.4% proveniente de cuarentena, el 28.6% de clones promisorios del CINCAE solicitadas por el programa de variedades, y el 21.4% de variedades comerciales solicitadas por los ingenios (Cuadro 2). Entre el 2003 y el 2006 se incrementó la capacidad instalada del laboratorio de cultivo de tejidos, y entre el 2010 al 2013, se regularizó la producción. En los últimos cuatro años se ha producido semilla para establecer 10.4 has de semillero Fundación (Figura 6), con un promedio de 89600 plántulas/zafra, de las cuales el 28.9% corresponde a plántulas meristemáticas y el 71.1% a plántulas de yemas individuales; adicionalmente se ha entregado caña en pie y paquetes de 40 esquejes a partir de cada semillero fundación establecido en CINCAE. Esta última opción de menor costo para los ingenios, y de menor riesgo para la siembra, se ha planteado sembrando las plántulas meristemáticas en el CINCAE o un lote del Ingenio, para luego ser entregada a los tres ingenios en paquetes de semilla, y continuar con el esquema de semilleros sanos. Esta estrategia fue implementada en Luisiana y Argentina, y ha sido usada por más de 10 años (Hoy *et al.*, 2001; Noguera *et al.*, 2013). Con la semilla entregada por CINCAE, se inicia y complementa el proceso de producción de semilla sana de las variedades nacionales, liberadas por el CINCAE, y de las introducidas por los ingenios.

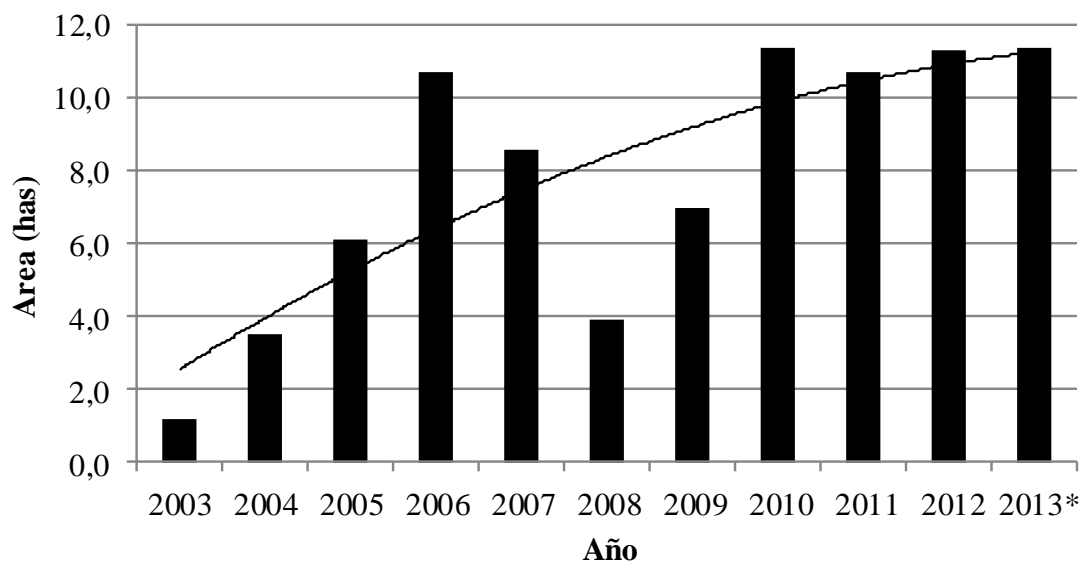


Figura 6. Área sembrada con semilla producida por el CINCAE para el establecimiento de semilleros Fundación. CINCAE, 2013.*Estimado a sembrar con semilla producida hasta Agosto del 2013.

Cuadro 2. Número de variedades que ingresaron al proceso de limpieza por cultivo de meristemos entre el 2003 y el 2013, de acuerdo a su origen. CINCAE, 2003-2013.

Año	Variedades comerciales	Clones		Subtotal
		Promisorios	Cuarentena	
2003	4	0	20	24
2004	4	5	8	17
2005	4	24	36	64
2006	8	9	19	36
2007	5	0	11	16
2008	6	0	20	26
2009	7	25	11	43
2010	8	4	0	12
2011	10	4	2	16
2012	6	7	7	20
2013	9	14	12	35
Promedio	6	8	13	28

Efecto en la producción. Semilla de la variedad B76-78 producida a partir de plantas meristemáticas se cortó para establecer parcelas sanas, y compararlas con parcelas infectadas con el virus de la hoja amarilla y/o sembradas con semilla inoculada con la bacteria causante del raquitismo *Lxx*. En la Figura 7 se puede observar como las parcelas libres de SCYLV, mostraron mayores producciones que las infectadas, con un 20% más TCH, 15% más sucrosa/TC y un 36% más TAH en caña planta. En la soca se evidenció 14.1% de reducción en TAH con raquitismo y 25.6% con SCYLV; mientras que, la combinación de las dos enfermedades no mostró sinergismo de las dos enfermedades, pero si una reducción del 24.6% en el TAH. Para el caso de raquitismo, las parcelas sanas produjeron 43.8% y 41.2% más TCH y TAH comparadas con el testigo infectado. Resultados similares han sido reportados por varios autores. Guevara *et al.*, (2005), observó un incremento del 27% en la producción de la variedad B69-613, teniendo 151 TCH la combinación de tratamientos de limpieza de semilla, comparado con 114 TCH del testigo. Flynn *et al.*, 2005 observó un 13.5% más TCH y TAH al usar semilla proveniente de cultivo de meristemas. Estos resultados indican la importancia económica que tienen el raquitismo y la hoja amarilla, tanto en la producción de caña y azúcar, cuando se siembra una variedad susceptible y es infectada con la enfermedad. Por otro lado, el beneficio de sembrar semilla sana proveniente de cultivo de meristemas, se reflejó en los incrementos significativos de la producción de caña y azúcar, observados en caña planta y primera soca.

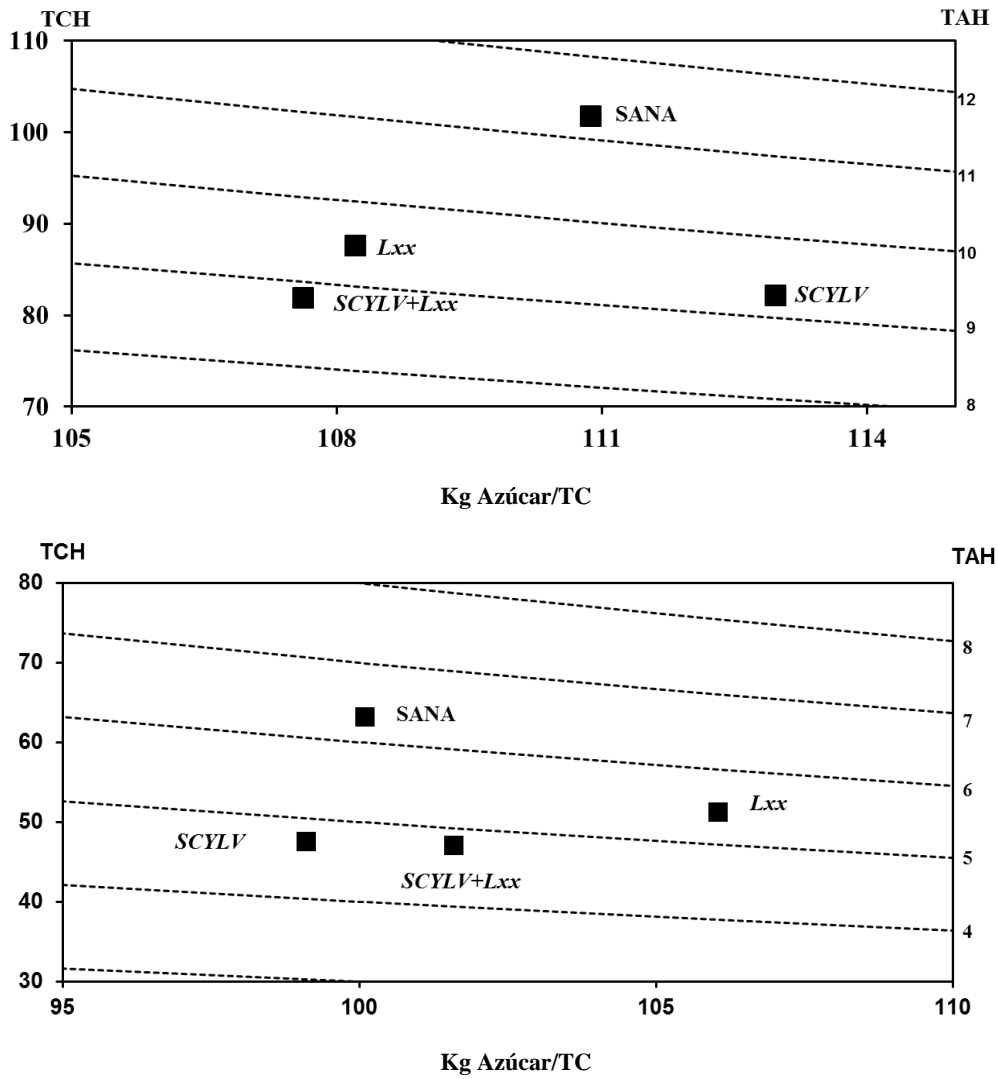


Figura 7. Efecto del Raquitismo (*Lxx*), Hoja Amarilla (SCYLV) y su combinación sobre TCH, TAH y KATC, en la variedad B76-78, caña planta (Arriba) y primera soca (Abajo). CINCAE, 2007.

Resistencia a raquitismo y hoja amarilla. La inoculación y el diagnóstico de laboratorio ha permitido identificar clones resistentes al raquitismo y la hoja amarilla en estados avanzados de selección del programa de mejoramiento del CINCAE. Cuando se determinó la reacción al raquitismo de la soca (*Leifsonia xyli* subsp *xyli* Davis) en los clones del estado IV de las series 1998 al 2004, se encontró que en las siete series, el 13.7% de los clones reaccionó como resistentes (Cuadro 3 y 4), especialmente las de los años 2003 y 2004. Para hoja amarilla, se evidenció un incremento de los clones resistentes en las últimas series. Considerando los clones con infección intermedia y alta como susceptibles (Victoria *et al.*, 2005), el 63% de los clones calificó como susceptible a la infección con el virus de la hoja amarilla. Es decir, que el 37% de los clones se consideró resistente, por lo que en las condiciones de la costa ecuatoriana, se contaría con fuentes de resistencia a la enfermedad (Cuadro 5 y 6). Estos resultados concuerdan con Schenck *et al.*, (2001), quien sugirió que la resistencia a la infección existe, así como variación en el nivel de tolerancia y expresión de síntomas entre variedades. Comstock *et al.*, (1999), indicó que posiblemente las familias evaluadas en el estado I del programa de mejoramiento de Canal Point (Florida), con menos frecuencia de infección del SCYLV, eran probablemente más resistentes. El mismo autor encontró una alta tasa de infección del SCYLV que se incrementó al avanzar el programa de mejoramiento, siendo pocos los clones resistentes que llegaron a los estados finales. Aunque en el programa de mejoramiento del CINCAE, los clones de las primeras series eran todos susceptibles, en las últimas series se ha reducido a un 25% (Cuadro 5 y 6). Entre los progenitores de los clones considerados resistentes se encuentran las variedades V71-51 (Hembra) y la SP80-1816 (Macho), de las cuales en Cenicaña, Colombia la variedad V71-51 calificó como tolerante al SCYLV; mientras que, en CTC-Brasil la SP80-1816 calificó como resistente. Estos resultados indican que el uso de la resistencia para hoja amarilla es una alternativa promisoriosa, teniendo en cuenta los resultados de este trabajo, y lo publicado por Victoria *et al.* (2005), quienes observaron segregación de la resistencia, encontrando más tarde Abu-Ahmad *et al.* (2007) variación en la infección entre variedades y su origen geográfico.

Cuadro 3. Frecuencia de clones de las series 1998 al 2004, con diferente nivel de resistencia al raquitismo de la soca (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*), de acuerdo al porcentaje de haces vasculares infectados por la bacteria. CINCAE, 2013.

Serie	Número de clones por tipo de reacción ^{1/}					Subtotal	% clones resistentes
	Resistente	Moderadamente resistente	Moderadamente susceptible	Susceptible			
1998	0	0	0	8	8	0,0	
1999	0	0	0	3	3	0,0	
2000	0	0	0	6	6	0,0	
2000b	1	0	0	11	12	8,3	
2001	0	1	2	9	12	8,3	
2002	1	0	1	9	11	9,1	
2003	2	1	0	7	10	30,0	
2004	3	1	3	5	12	33,3	
Subtotal	7	3	6	58	74		
Porcentaje (%)	9,5	4,1	8,1	78,4		13,7	

1/ Escala de 1 a 4 propuesta por Comstock (2001).

Cuadro 4. Clasificación de clones del estado IV y variedades liberadas por el CINCAE de acuerdo a su nivel de resistencia al raquitismo de la soca (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) CINCAE, 2013.

Grado de reacción 1/	Descripción de la reacción	Clones			
1	Resistente	ECSP2000-1335	ECSP04-043	EC03-619	ECSP04-323
		ECSP02-040	EC03-256	ECSP04-494	
2	Moderadamente resistente	EC01-750	ECSP03-404	EC04-161	
3	Moderadamente susceptible	EC01-747	EC02-173	EC04-168	
		EC01-734	ECSP04-743	EC04-167	
4	Susceptibles	ECSP98-419	EC-03	EC-06	ECSP02-187
		ECSP98-392	EC-04	ECSP01-186	EC03-247
		ECSP98-425	ECSP2000-1308	ECSP01-270	ECSP03-474
		ECSP98-149	ECSP2000-1314	ECSP01-445	ECSP03-104
		ECU-01	ECSP2000-1462	ECSP01-441	ECSP03-448
		ECSP98-168	ECSP2000-890	ECSP01-166	ECSP03-489
		ECSP98-127	ECSP2000-1315	EC01-744	ECSP03-128
		ECSP98-499	ECSP2000-1258	EC02-175	EC03-590
		ECSP1999-169	ECSP2000-1336	ECSP02-192	ECSP04-316
		ECSP1999-171	ECSP2000-1259	ECSP02-204	ECSP04-322
		ECSP1999-457	ECSP2000-1030	EC02-301	ECSP04-232
		ECSP2000a-161	ECSP2000-958	ECSP02-093	ECSP04-314
		ECSP2000a-168	ECSP2000-891	ECSP02-209	EC04-236
		ECSP2000a-181	ECSP01-055	ECSP02-179	
		EC-02	EC-05	ECSP02-242	

1/ Escala de 1 a 4 propuesta por Comstock (2001).

Cuadro 5. Frecuencia de clones de las series 1998 al 2004, con diferente nivel de resistencia a la hoja amarilla (*Sugarcane yellow leaf virus*, SCYLV-polerovirus), de acuerdo al porcentaje de incidencia. CINCAE, 2013.

Series	Número de clones por tipo de infección				Subtotal	% clones resistentes
	Ausente*	Baja	Intermedia	Alta		
1998	0	0	3	5	8	0,0
1999	0	0	1	8	9	0,0
2000	1	4	2	7	14	35,7
2000b	2	1	4	6	13	23,1
2001	3	1	3	7	14	28,6
2002	3	1	3	5	12	33,3
2003	6	3	1	0	10	90,0
2004	8	1	3	0	12	75,0
Subtotal	23	11	20	38	92	
Frecuencia (%)	25,0	12,0	21,7	41,3		

* Infección ausente = 0% de incidencia, baja = 0.1-10% incidencia, intermedia = 10 - 40% Incidencia, y alta = 40,1-100% incidencia)

Cuadro 6. Clasificación de clones del estado IV y variedades liberadas por el CINCAE de acuerdo a su nivel de resistencia al virus de la hoja amarilla (*Sugarcane yellow leaf virus*, SCYLV-polerovirus). CINCAE, 2013.

Infección	Descripción	Clones				
Ausente (0% incidencia)		ECSP2000-255	ECSP01-734	EC03-590	EC04-161	ECSP04-314
		ECSP2000-1259	ECSP02-192	EC03-619	EC04-167	ECSP04-316
		ECSP2000-1315	ECSP02-204	ECSP03-104	EC04-168	ECSP04-743
		ECSP01-186	ECSP02-209	ECSP03-128	EC04-236	
		ECSP01-307	EC03-256	ECSP03-489	ECSP04-232	
Baja (0.1-10% incidencia)		ECSP2000a-161	ECSP2000a-509	ECSP02-242	ECSP03-474	
		ECSP2000a-168	ECSP2000-1314	ECSP03-448	ECSP04-043	
		ECSP2000a-176	EC-05	EC03-247		
Intermedia (10 - 40% Incidencia)		ECU-01	EC-03	ECSP2000-890	EC01-750	ECSP03-404
		ECSP98-127	ECSP1999-497	ECSP2000-958	EC02-175	ECSP04-322
		ECSP98-419	ECSP2000-1462	EC-06	ECSP02-040	ECSP04-323
		EC-04	ECSP2000-668	ECSP01-726	ECSP02-093	ECSP04-494
Alta (40,1-100% incidencia)		ECSP98-392	ECSP1999-306	ECSP2000a-241	ECSP2000-891	ECSP02-187
		ECSP98-499	ECSP1999-393	EC-02	ECSP2000-1030	ECSP01-445
		ECSP1999-169	ECSP1999-434	ECSP2000a-182	EC01-744	ECSP02-230
		ECSP1999-171	ECSP1999-445	ECSP2000a-216	EC01-747	EC02-173
		ECSP1999-505	ECSP98-168	ECSP2000-1258	ECSP01-055	EC02-301
		ECSP98-149	ECSP2000a-601	ECSP2000-1308	ECSP01-166	ECSP02-179
		ECSP98-425	ECSP2000a-181	ECSP2000-1335	ECSP01-270	
		ECSP1999-222	ECSP2000a-510	ECSP2000-1336	ECSP01-441	

Diagnóstico de raquitismo, escaldadura y hoja amarilla para la selección de semilla sana. El servicio de diagnóstico de raquitismo, escaldadura y hoja amarilla, se ha ido incrementando desde el 2001 hasta la actualidad cubriendo el 100% de los semilleros. El uso de técnicas de diagnóstico y la continua vigilancia y selección de semilla durante varios años, ha dado como resultado la disminución de la incidencia del raquitismo (Davis & Bailey, 2000), en países como Colombia, Sur África y USA (Victoria *et al.*, 1999; Bailey & McFarlane, 1999; Hoy & Flynn, 2001). Todos los años las área de agronomía y siembra envían entre 36000 a 40000 muestras de la hoja TVD+3, y del tercio basal del tallo, para la evaluación de enfermedades al laboratorio de Fitopatología del CINCAE. En promedio se han evaluado 2550 hectáreas en los últimos cinco años; provenientes de canteros comerciales, semilleros básicos y lotes comerciales (Figura 7). A partir de esta área evaluada, los ingenios seleccionan los semilleros para la siembra de unas 9000 ha. comerciales en los ingenios San Carlos, Valdez y La Troncal. En Colombia, debido al establecimiento de un esquema de producción de semilla sana y diagnóstico, se redujeron los niveles de incidencia del raquitismo del 15.3% en 1981 a un 0.7% en el 1999, Victoria *et al.*, (1999). En Luisiana, USA, se disminuyeron los niveles de incidencia del raquitismo entre 1997 y el 2000 del 12% al 3% (Hoy & Flynn, 2000). También, Bailey & McFarlane (1999) en Sur África, luego de dos décadas, se pasó de 25% de incidencia a finales de los 70's al 2% en 1997. En la costa del Ecuador, el promedio de incidencia en los semilleros de los ingenios San Carlos, Valdez y La Troncal, pasó en 13 años de manejo preventivo de raquitismo de 41.7% a un 0.7% del año 1999 al 2012 (Cuadro 7 y Figura 8). Para el caso de la escaldadura de la hoja se redujeron los niveles por debajo del 1%, aunque se hayan multiplicado variedades susceptibles, manteniendo niveles bajos por más de 9 años (Cuadro 7 y Figura 9). De la misma forma la hoja amarilla ha disminuido sus niveles de incidencia de un 36.4% desde el 2001, alcanzando los niveles más bajos de incidencia del 9.6% en el 2012, gracias a la multiplicación y siembra de semilla sana de variedades tolerantes a la enfermedad (Cuadro 7 y Figuras 9 y 10). Actualmente las variedades con mayor área sembrada son la ECU-01 (31.8%), EC-02 (3.6%), CC85-92 (35.4%), Ragnar (9.7%), y CR74-250 (6.9%), teniendo en el 2012 las tres primeras los menores niveles de incidencia ponderada en los tres ingenios (Figura 11). Sin embargo, es importante continuar con el monitoreo, ya que en el 2012 se observaron lotes con niveles máximos de incidencia del 42.5% para raquitismo, 10% para

escaldadura y 56.7% para hoja amarilla, los cuales fueron descartados a tiempo como fuente de semilla (Cuadro 7).

Cuadro 7. Promedios y máximos porcentajes de incidencia de raquitismo, escaldadura y hoja amarilla en semilleros y canteros caña planta de los Ingenios San Carlos, La Troncal y Valdez durante la zafra 2012. CINCAE, 2012.

INGENIO	AREA (ha)	RAQUITISMO		ESCALDADURA		HOJA AMARILLA	
		INCIDENCIA (%) ^{1/}	MAXIMO (%) ^{2/}	INCIDENCIA (%)	MAXIMO (%)	INCIDENCIA (%)	MAXIMO (%)
SAN CARLOS	594	0.5	25.0	0.4	5.0	15.8	100.0
LA TRONCAL	617	0.3	4.0	0.6	4.4	10.6	64.0
VALDEZ	1040	1.0	42.5	1.1	10.0	6.4	56.7
	2251	0.7	42.5	0.8	10.0	9.6	100.0

1/Incidencia de hojas y tallos afectados en cada lote y ponderada por el área evaluada. 2/Máximo nivel de incidencia detectado durante la temporada de diagnóstico.

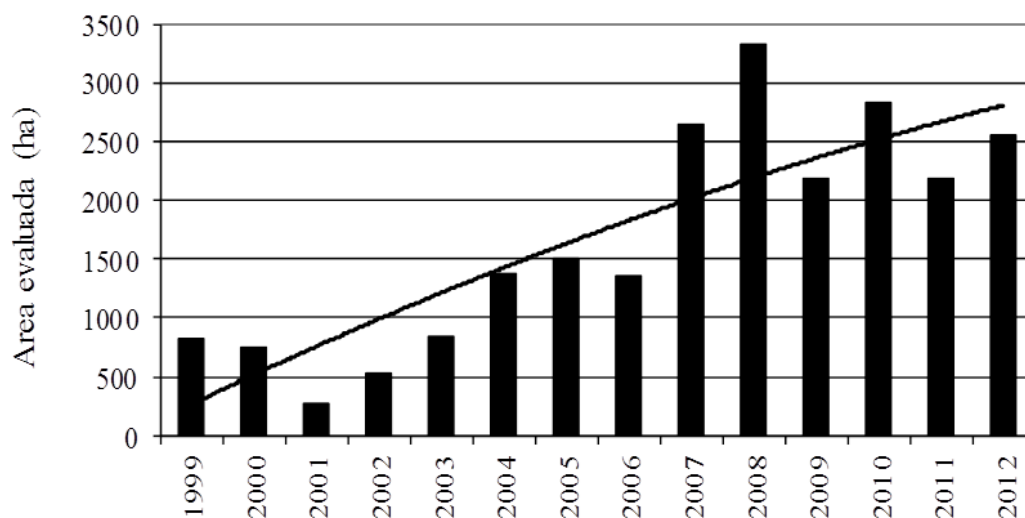


Figura 7. Incremento del área de semilleros evaluados mediante diagnóstico inmunoenzimático por DBIA y TBIA para la detección de raquitismo (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*), escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans*) y hoja amarilla (SCYLV-polerovirus), en la zona de influencia de los ingenios San Carlos, La Troncal y Valdez. El área evaluada se ha incrementado hasta alcanzar el 100% de los semilleros. CINCAE, 1999-2013.

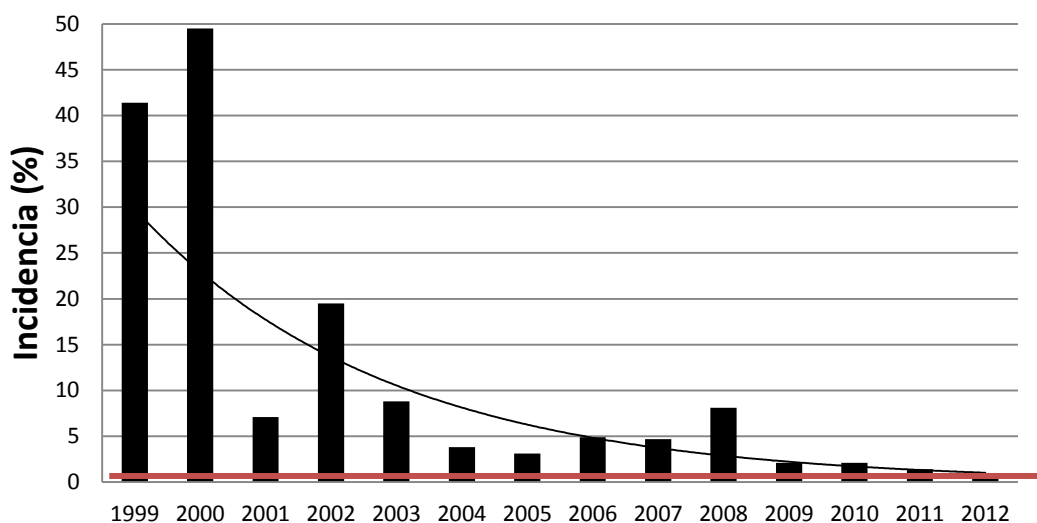


Figura 8. Cambio multianual de incidencia o porcentaje de tallos infectados con raquitismo (*Leifsonia xily* subsp. *xily*) en semilleros de los ingenios San Carlos, La Troncal y Valdez 1999-2012.

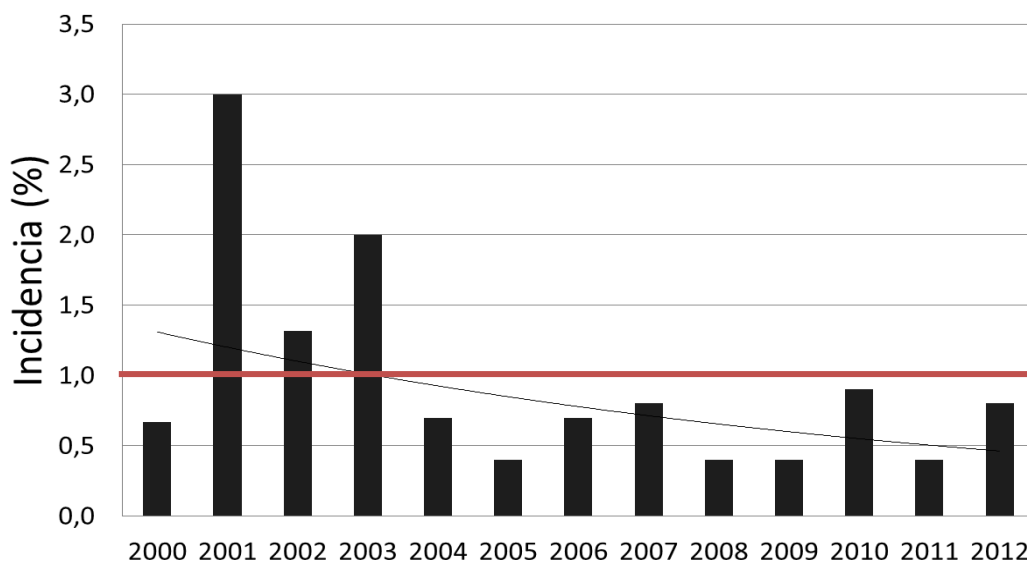


Figura 9. Cambio multianual de incidencia o porcentaje de cepas infectadas con escaldadura (*Xanthomonas albilineans*) en semilleros de los ingenios San Carlos, La Troncal y Valdez 2000-2012

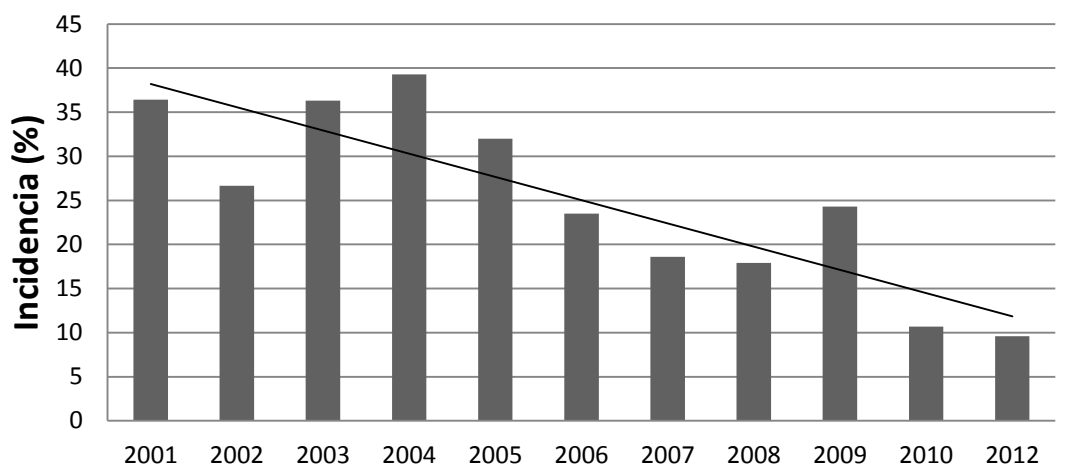


Figura 10. Cambio multianual de la incidencia o porcentaje de cepas infectadas con la hoja amarilla (ScYLV-Poliovirus) en semilleros de los ingenios San Carlos, La Troncal y Valdez 2001-2012

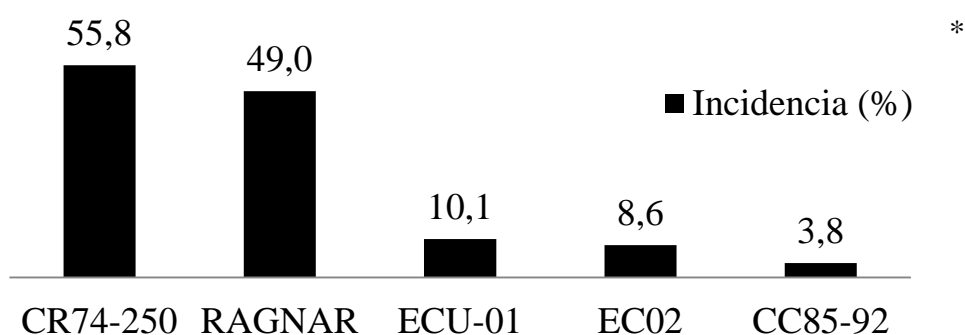


Figura 11. Incidencia del virus de la hoja amarilla en las variedades comerciales de los ingenios San Carlos, La Troncal y Valdez. CINCAE, 2012. *Incidencia ponderada por el área en 1899 ha.

III Congreso AETA, Sep.18-20 del 2013. Guayaquil-Ecuador

La disminución de los niveles de incidencia de raquitismo, escaldadura y hoja amarilla, ha ocurrido por el manejo preventivo que los ingenios San Carlos, La Troncal y Valdez, apoyados por el CINCAE, han realizado durante un periodo de 15 años. El establecimiento de un esquema de producción de semilla sana, que utiliza todas las medidas preventivas discutidas, se integran en un proceso que se inicia con el semillero Fundación sembrado en el CINCAE e ingenios, seguido por semilleros básicos y comerciales establecidos en los ingenios. Donde el diagnóstico serológico y molecular son una herramienta de decisión para seleccionar lotes sanos con criterios de sanidad. Adicional al diagnóstico, en cada una de las etapas se realiza una limpieza de la semilla, mediante tratamientos térmicos y el cultivo de meristemas. El CINCAE produce semilla sana para establecer los semilleros Fundación; luego, los ingenios realizan un tratamiento con agua caliente antes de sembrar los semilleros básicos para asegurar la sanidad de la semilla. Para evitar transmitir enfermedades sistémicas, durante todo el proceso desde la selección de las plantas madres para extraer sus meristemas, hasta el corte de semilla para las siembras comerciales, se realiza la desinfección de herramientas de corte con amonio cuaternario. Adicional a este manejo, la búsqueda de resistencia, o la identificación de clones resistentes es una medida de manejo importante. Los clones identificados como resistentes a enfermedades como el raquitismo y la hoja amarilla pueden ser empleados como progenitores en los cruzamientos del programa de mejoramiento, o ser liberados como futuras variedades. Entre las liberadas por el CINCAE, la EC-05 se consideró con bajo nivel de infección, considerándose resistente a SCYLV. CINCAE ha planificado realizar un estudio de progenie con el ánimo de estudiar la herencia a la resistencia del virus de la hoja amarilla, SCYLV, teniendo en cuenta progenitores resistentes como la V71-51 y la SP80-1816. También, experimentos a nivel de invernadero, empleando poblaciones controladas del vector *Melanaphis sacchari* y cuantificando la población del virus por qPCR, se llevarán a cabo con el ánimo de confirmar el nivel de resistencia observado en el campo. Teniendo en cuenta los efectos que enfermedades como el raquitismo y la hoja amarilla causan en variedades susceptibles, la industria está asegurando la producción y su estabilidad a través de los cortes, al permitir la expresión del potencial de las variedades de reciente introducción y las liberadas por el CINCAE, cuando produce y siembra semilla sana. La frase de cajón "es mejor prevenir que lamentar", aplica en un cultivo como la caña de azúcar, donde el 95% del éxito del control de enfermedades depende de las medidas preventivas. Una vez establecido un cantero es poco lo que se puede hacer si este se siembra con semilla contaminada.

CONCLUSION

El manejo preventivo del raquitismo, escaldadura de la hoja y la hoja amarilla ha permitido ir disminuyendo los niveles de estas tres enfermedades en los semilleros de los ingenios, a través de la selección de semilla sana, desinfección de herramientas de corte y la siembra de nuevas variedades tolerantes a enfermedades sistémicas.

AGRADECIMIENTOS

A Alexandra Gomez, Carmen Balladarez, Tamara Espinoza, y Carmen Muñoz, Giovanni Quiridumbay, al tesista Carlos Burbano, por su soporte en los diferentes proyectos. De la misma forma al personal de los ingenios, Edgar Sánchez y Oscar Nuñez del Ingenio San Carlos; Glenda Toala, Vilma Contreras y el Dr. Norge Bernal del Ingenio La Troncal; Walter Jara y Carlos Cabezas del Ingenio Valdez. A Jorge Victoria, Jeff Hoy, Alvaro Sanguino, y Li-Tao Yang por los antisueros cedidos. Al INIAP Azuay por su colaboración con la cuarentena cerrada y al FIADE por su apoyo económico y confianza.

BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Ahmad, Y., Costet, L., Daugrois, J.-H., Nibouche, S., Letourmy, P., Girard, J.-C., & Rott, P. 2007. Variation in infection capacity and in virulence exists between genotypes of Sugarcane yellow leaf virus. *Plant Disease*. 91(3):253-259.
- 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.
- Buenaventura, C. 1990. Semilleros y siembra de la caña de azúcar. Serie Técnica No. 6. CENICAÑA. Cali, Colombia. 10 p.
- Buenaventura, C. 1997. Diagnóstico del Cultivo de la Caña de Azúcar en Ecuador. Informe FIADE. 42 p.
- Castillo, R.O., Gómez, A., y Garcés, F. 2003. Multiplicación masiva de semilla sana de variedades de caña de azúcar mediante cultivo de tejidos vegetales. CINCAE. El Triunfo, Ecuador. 12 p.
- Cerón, G.E.F. 1997. Metodología para la regeneración de plantas a partir de cultivos de células individuales en suspensión y aislamiento de protoplastos de híbridos de caña de azúcar *Saccharum* spp. Palmira, Colombia. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias. 147 p.
- Champoiseau, P., Daugrois, J.H., Pieretti, I., Cociancich, S., Royer, M., and Rott, P. 2006. High variation in pathogenicity of genetically closely related strains of *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen, in Guadeloupe. *Phytopathology* 96(3):1081-1091

III Congreso AETA, Sep.18-20 del 2013. Guayaquil-Ecuador

- Chatenet, M.; Delage, C.; Ripolles, M.; Lockhart, B. & Rott, P. 2001. Detection of Sugarcane Yellow Leaf Virus in Quarantine and Production of Virus-free Sugarcane by Apical Meristem Culture. *Plant Disease* 85(11):1177-1180.
- CINCAE (Centro de investigación de la caña de azúcar del Ecuador). 2013. Informe anual 2012. El Triunfo, Ecuador. 57 p.
- Comstock J.C. 2001. Breeding for Ratoon Stunting disease resistance; is it both possible and effective?. En: Proceedings, Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists ISSCT, 24. Brisbane, Australia. 17 – 21 Sep., 2001, pp. 471-476.
- Comstock, J.C., Miller, J.D., Tai, P.Y.P., & Follis, J.E. 1999. Incidence of and resistance to sugarcane yellow leaf virus in Florida En: Proceedings, Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists ISSCT, 23. New Delhi, India. 22-26 Feb v.1, p.366-372. (ISSN) 81-85871-28-0.
- Davis, M.J., Rott, P., and Monge, G.A. 1997. Multiplex polymerase chain reaction (PCR) for diagnosis of leaf scald and ratoon stunting diseases. *Sugar y Azucar* 92(6):26.
- _____, Rott, P. Warmuth, C. J. Chatenet, M. & Baudin. P. 1997. Intraspecific Genomic Variation Within *Xanthomonas albilineans*, the Sugarcane Leaf Scald Pathogen. *Phytopathology* 87(3): 316-324
- _____, & Bailey, A. 2000. Ratoon stunting. En: A guide to sugarcane diseases. Rott, P., Baily, R.A., Comstock, J.C., Croft, B.J., Saumtally, S. (Editores). CIRAD-ISSCT. Montpellier, Francia. pp. 49-54. ISBN 2-87614-386-0.
- Fitch, M. M. M., Lehrer, A. T., Komor, E., & Moore, P. H. 2001. Elimination of Sugarcane yellow leaf virus from infected sugarcane plants by meristem tip culture visualized by tissue blot immunoassay. *Plant Pathology* 50: 676-680
- Flynn, J., Powell, G., Perdomo, R., Montes, G., Quebedeaux, K., & Comstock, J. 2005. Comparison of sugarcane disease incidence and yield of field-run, heat-treated, and tissue-culture based seedcane. *Journal American Society of Sugar Cane Technologists*. 25:88-100
- Garces, F.F. 2000. Principales enfermedades de la caña de azúcar en Ecuador y Estrategias para su manejo y control En: Carta Informativa del CINCAE. 2(2):7-12.
- _____, 2003. Manejo Preventivo de los Principales problemas fitopatológicos de la caña de azúcar en Ecuador. En: Cultivo de la Caña de Azúcar en Ecuador. Memorias AETA. Guayaquil-Ecuador. p. 47-74
- _____, Balladarez C., Quiridumbay G. and Muñoz C. 2005. Diagnosis of Leaf Fleck, Leaf Scald, Mosaic, Ratoon Stunting Disease and Yellow Leaf of Sugarcane In Commercial Fields and Quarantine In Ecuador. En: Proceedings, Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists ISSCT, 25. Ciudad de Guatemala, Guatemala. 30 Jan.- 4 Feb., 2005 v.2, p.695-700. (ISSN) 99922-2-201-7

- _____, Gutierrez, A., and Hoy, J. W. 2013. Detection and quantification of *Xanthomonas albilineans* by qPCR and potential characterization of sugarcane resistance to leaf scald. Plant Disease, PDIS-04-13-0431-RE. (En publicación).
- _____, Fiallos F. Martínez, F., Silva E., Aime C., Glynn N., Comstock, J., y Lysa Castlebury. 2013. First Report of Orange Rust of Sugarcane caused by *Puccinia kuehnii* in Ecuador. Plant Disease, PDIS-05-13-0574-PDN (En publicación)
- Gillaspie, A.G. Jr. & Teakle, D.S. 1989. Ratoon stunting disease. En: Diseases of sugarcane. Major Diseases. Ricaud, C., Egan, B.T., Gillaspie, Jr., & Hughes, C.G. (Editores). Elsevier Science Publishers B.V. pp. 59-80.
- Grisham, M.P., Pan, Y.B., and Richard, E.P., Jr. 2007. Early detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane leaves by real-time polymerase chain reaction. Plant Dis. 91:430-434.
- Gomez, A. & Fiallos, F. (Sin publicar). Diagnóstico molecular de la hoja amarilla. CINCAE, 2010.
- Guevara, L. & Ovalle, W. 2005. Effect of treatments to eliminate systemic pathogens from sugarcane setts. En: Proceedings, Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists ISSCT, 25. Ciudad de Guatemala, Guatemala. 30 Jan.- 4 Feb., 2005 v.2, p.623-628. (ISSN) 99922-2-201-7
- Guzmán, M. L. ; Victoria, J.I. 2000. Desarrollo de técnicas para el diagnóstico de enfermedades de la caña de azúcar. En: Tecnicaña. V Congreso. Memorias. CD
- Harrison, N.A., & Davis, M.j. 1988. Colonization of vascular tissues by *Clavibacter xyli* subsp *xyli* in stalks of sugarcane cultivars differing in susceptibility to ratoon stunting disease. *Phytopathology* 78:722-727.
- Hoy, J.W., & Flynn, J.L. 2001. Control of ratoon stunting disease of sugarcane in Louisiana with seedcane produced through micropropagation and resistant cultivars. En: Proceedings, Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists ISSCT, 24. Brisbane, Australia. 17 – 21 Sep., 2001, pp.417-421.
- _____, Bischoff, K.P., Milligan, S.B., and Gravois, K.A. 2003. Effect of tissue culture explant source on sugarcane yield components. *Euphytica* 129:237–240.
- Joomun, N., Parmessur, Y., Antoine, M., & Dookun-Saumtally, A. 2013. Screening for Sugarcane yellow leaf virus in quarantine in Mauritius. *In*: Proceedings, Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists ISSCT, 28. Sao Pablo, Brasil. 24 – 27 Jun., 2013, 12 p.
- Moonan, F., Molina, J., & Mirkov, E. 2000. Sugarcane Yellow Leaf Virus: An Emerging Virus That Has Evolved by Recombination between Luteoviral and Poleroviral Ancestors. *Virology* 269:156-171.

III Congreso AETA, Sep.18-20 del 2013. Guayaquil-Ecuador

- Noguera, A.S. Paz, N. del V., Díaz, M.E. Perera, M.F. Díaz Romero, C., García M.B., Filippone, M.P., Welin B., Cuenya, M.I., Digonzelli, P.A. And Castagnaro, A.P. 2013. Production of healthy seed cane in Tucumán, Argentina. En: Proceedings, Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists ISSCT, 28. Sao Pablo, Brasil. 24 – 27 Jun., 2013, 9 p.
- Shenck, S.; Hu, J.S. y Lockhart, B.E. (1997). Use of a tissue blot immunoassay to determine the distribution of sugarcane yellow leaf virus in Hawaii. En: Sugar Cane (4): p5-14.
- Rao, G., Sharma, S.K., Singh, D., Arya, M., Singh, P., and Baranwal, B.K. 2013. Genetically diverse sugarcane bacilliform viruses infecting Sugarcane crops in india: evidence of a novel recombinant *Badnavirus* species. In: Proceedings, Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists ISSCT, 28. Sao Pablo, Brasil. 24 – 27 Jun., 2013, 12 p.
- Rott, P. Davis, M.J. 2000. Leaf Scald. En: A guide to sugarcane diseases. Rott, P., Baily, R.A., Comstock, J.C., Croft, B.J., Saumtally, S. (Editores). CIRAD-ISSCT. Montpellier, Francia. ISBN 2-87614-386-0. pp. 38-44.
- Ricaud, C. & Ryan, C.C. 1989. Leaf Scald. En: Diseases of sugarcane. Major Diseases. Ricaud, C., Egan, B.T., Gillaspie, Jr., & Hughes, C.G. (Editores). Elsevier Science Publishers B.V. pp. 39-58.
- Victoria, J.I., Guzmán, M.L. y Angel, F. 1995. Enfermedades de la caña de azúcar en Colombia. En: C. Cassalet, J. Torres y C. Isaacs (editores). El Cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia. CENICAÑA; Cali, Colombia. pp. 265-293.
- _____, & Calderón, H. 1995. Establecimiento de semilleros y multiplicación de variedades. En: C. Cassalet, J. Torres y C. Isaacs (editores). El Cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia. CENICAÑA; Cali, Colombia. pp. 115-129.
- _____, 1996. Principales problemas sanitarios del cultivo de la caña de azúcar en Colombia. En: Memorias III Foro de sanidad vegetal. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. P 114-137
- _____, Guzmán Romero, M.L. ; Garcés, F.F. ; Jaramillo, A.D. 1999. Pathogen-free seed cane production and its impact on a commercial scale. Proceedings, Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists ISSCT. New Delhi, India. Feb. 22 – 26.
- _____, Avellaneda B.M.C., Angel, S.J.C., Guzman, M.L. 2005. Resistance to Sugarcane Yellow Leaf virus in Colombia. En: Proceedings, Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists ISSCT, 25. Ciudad de Guatemala, Guatemala. 30 Jan.- 4 Feb., 2005 v.2, p.664-670. (ISSN) 99922-2-201-7
- Viveros, C.A.; Cassalet C.; Victoria J.I. 1997. Multiplicación rápida de la caña de azúcar por el sistema de plántulas. CENICAÑA. Cali, Colombia. 20 p.