

Efecto de diferentes tiempos de termoterapia sobre la presencia del virus de la hoja amarilla (SCYLV) y la sobrevivencia de plantas de caña de azúcar de la variedad CC 01-1940 y CC 12-2120 durante el proceso de cultivo *in vitro*

Juan Pablo Vélez García

Directores:

Juan Carlos Ángel, Ingeniero agrónomo (M.Sc.) CENICAÑA

Leonardo Álvarez Ríos, Ingeniero agrónomo (Ph.D.) UNAD

Línea de Investigación:

Cultivo *in vitro*

Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD)

Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente (ECAPMA)

Palmira Valle del Cauca, Colombia

Programa de Agronomía

2024

Dedicatoria

A Dios por permitirme vivir esta maravillosa experiencia. A mi madre, por el amor y la confianza incondicional. A mi padre, por los consejos y motivación. A mi hermano, por su compañía en la alegría y en el fracaso. A toda mi familia por creer en mí. A mis amigos y amigas, por las experiencias vividas y conocimientos compartidos. A mis profesores, por la dedicación y pasión en su labor. A la UNAD y a Cenicaña, por esta grata oportunidad, llena de aprendizajes y buenos momentos.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer profundamente A Dios, por darme la vida, sabiduría y fortaleza para culminar esta etapa académica.

Al director del proyecto el M.Sc. Juan Carlos Ángel Sánchez, por su confianza y dedicación, sin sus palabras y correcciones precisas no hubiese podido lograr llegar a esta instancia tan anhelada.

Al director del proyecto, el Ph.D. Leonardo Álvarez Ríos, por su dedicación, comprensión, paciencia y entrega a lo largo del proceso de investigación.

A la M.Sc. Eliana Andrea Rincón, por las horas compartidas, los trabajos realizados en conjunto y las historias vividas.

A Cristian Camilo Cadena, por su constante apoyo, sus indicaciones y orientaciones indispensables en el desarrollo de este proyecto aplicado, quisiera destacar la buena actitud que lo caracteriza.

A Roció del Pilar Barrios, por todas las experiencias y enseñanzas compartidas, por su manera de guiarme y motivarme cuando me sentía perdido y sin salida, mi sincero agradecimiento.

A Yuli Viviana Sarria, una mujer guerrera que me ha enseñado a ser resiliente y a nunca desistir de mis sueños, infinitas gracias.

A mi madre Adriana Garcia Potes, por ser el motor que me impulsa en busca de mis sueños y esperanzas.

A mi padre Orlando Mauricio Velez Gutiérrez, por su apoyo y motivación en los momentos difíciles.

A mi hermano Julián Andrés Velez Garcia, por creer y estar siempre ahí cuando más lo necesito.

A toda mi familia, compañeros del área de fitopatología, UNAD y Cenicaña en general, que de alguna manera han contribuido de manera positiva en el desarrollo de este proyecto. A todos los mencionados, mis más sinceros agradecimientos.

Resumen

El cultivo *in vitro* es una técnica utilizada para el mantenimiento, multiplicación y limpieza vegetal en condiciones controladas, con nutrición heterotrófica, en recipientes de vidrio o plásticos, ausentes de contaminantes biológicos. En el centro de Investigación de la Caña de Azúcar CENICAÑA, se utiliza el cultivo *in vitro* de las células meristemáticas, para la obtención de plantas sanas de caña de azúcar (*Saccharum* spp.), a partir de material parental sano e infectado con virus de la hoja amarilla (SCYLV); técnica que ofrece ventajas para la agricultura sostenible y además es una alternativa importante en la multiplicación masiva de plantas sanas libre de microorganismos patógenos. El (SCYLV) es una enfermedad que ha reportado pérdidas significativas de rendimiento de azúcar y TCH en diferentes regiones del mundo, es propagado por el áfido *Melanaphis sacchari* de manera persistente, uno de los métodos más eficientes es la prevención mediante producción de plantas provenientes de cultivo *in vitro*, proceso que da como resultado la obtención de plantas sanas libres de patógenos. Uno de los pasos del cultivo *in vitro* que favorece la obtención de plantas sanas es la termoterapia, tratamiento fundamental para detener la reproducción de enfermedades sistémicas como el SCYLV, consiste en someter las plantas de caña de azúcar con dos meses de edad, previo a la extracción del meristemo, a tratamiento térmico durante 21 días a 41°C. Sin embargo, durante esta etapa hay pérdidas en la calidad de las células meristemáticas lo cual se asocia a la disminución de la viabilidad e incrementos en costos de producción. De acuerdo con lo anterior, para solucionar esta problemática se realizó este experimento en donde se evaluó el efecto de la disminución del tiempo de la termoterapia sobre la presencia de SCYLV y la sobrevivencia de plantas durante el proceso de cultivo *in vitro* de caña de azúcar en las variedades CC 01-1940 y CC 12-2120. Se

evaluaron dos tratamientos correspondientes a dos tiempos de permanencia en cámara de termoterapia T10 y T15 (días), se compararon con un testigo comercial T21 (días) que corresponde al tiempo de permanencia que se utiliza en el protocolo actual de Cenicaña y un testigo absoluto T0 que corresponde a 21 días en condiciones controladas de invernadero ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). Se evaluaron 39 plantas por tratamiento de la variedad CC 01-1940 y 27 plantas por tratamiento de la variedad CC 12-2120, distribuidas de manera aleatoria (DCA) dentro de la cámara de tratamiento térmico. Las variables respuesta fueron mortalidad y sanidad. Para el análisis de datos se utilizó un modelo lineal generalizado mixto con variable de respuesta binaria, efecto fijo (tratamiento) y efecto aleatorio (etapa), también se realizaron pruebas de comparaciones múltiples (Bonferroni y Dunnett) con el fin de capturar todos los posibles pares que presentan diferencias estadísticas significativas en las dos variables de interés. Los resultados obtenidos indicaron que para la variable mortalidad una disminución en el tiempo de permanencia en cámara de termoterapia aumenta la sobrevivencia en ambas variedades de caña de azúcar evaluadas, siendo los tratamientos T0, T10 y T15 los que mostraron los menores porcentajes para la variable respuesta. Para la variable sanidad los menores valores se observaron en los tratamientos T15 y T21 (testigo), logrando un 0% de incidencia en las plantas de las dos variedades de caña de azúcar que sobrevivieron al final del proceso *in vitro*. Teniendo en cuenta estos resultados de las variables evaluadas y la importancia de la termoterapia, es posible reducir el tiempo de exposición a 15 días, a fin de aumentar la sobrevivencia y garantizar la eliminación del patógeno, también se confirma la importancia de la combinación de tratamiento térmico y extracción de meristemos apicales *in vitro* para hacer eficiente la eliminación de virus.

Palabras clave: Caña de azúcar, Cultivo *in vitro*, meristemas, reguladores de crecimiento, diagnóstico molecular, termoterapia, virus de la hoja amarilla, patógeno.

Abstract

In vitro culture is a technique used for plant maintenance, multiplication and cleaning under controlled conditions, with heterotrophic nutrition, in glass or plastic containers, absent of biological contaminants. At the CENICAÑA Sugarcane Research Center, *in vitro* culture of meristematic cells is used to obtain healthy sugarcane plants (*Saccharum* spp.), from healthy parental material infected with the yellow leaf (SCYLV); technique that offers advantages for sustainable agriculture and is also an important alternative in the massive multiplication of healthy plants free of pathogenic microorganisms. (SCYLV) is a disease that has reported significant losses in sugar and TCH yields in different regions of the world. It is persistently spread by the aphid *Melanaphis sacchari*. One of the most efficient methods is prevention through the production of plants from in-vitro cultivation, a process that results in obtaining healthy plants free of pathogens. One of the steps in vitro cultivation that favors obtaining healthy plants is thermotherapy, a fundamental treatment to stop the reproduction of systemic diseases such as SCYLV. It consists of subjecting sugarcane plants at two months of age, prior to extraction of the meristem, heat treatment for 21 days at 41°C. However, during this stage there are losses in the quality of the meristematic cells which is associated with a decrease in viability and increases in production costs. In accordance with the above, to solve this problem, this experiment was carried out where the effect of reducing the time of thermotherapy on the presence of SCYLV and the survival of plants during the in vitro cultivation process of sugar cane in the varieties CC 01-1940 and CC 12-2120. Two treatments corresponding to two residence times in the thermotherapy chamber T10 and T15 (days) were evaluated, they were compared with a commercial control T21 (days) that corresponds to the residence time used in

the current Cenicaña protocol and an absolute control T0 which corresponds to 21 days in controlled greenhouse conditions ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). 39 plants per treatment of the CC 01-1940 variety and 27 plants per treatment of the CC 12-2120 variety were evaluated, distributed randomly (DCA) within the heat treatment chamber. The response variables were mortality and health. For data analysis, a mixed generalized linear model was used with binary response variable, fixed effect (treatment) and random effect (stage), multiple comparison tests were also performed (Bonferroni and Dunnett) in order to capture all possible pairs that present significant statistical differences in the two variables of interest. The results obtained indicated that for the mortality variable, a decrease in the time spent in the thermotherapy chamber increases survival in both sugarcane varieties evaluated, with treatments T0, T10 and T15 being the ones that showed the lowest percentages for the response variable. . For the health variable, the lowest values were observed in treatments T15 and T21 (control), achieving a 0% incidence in the plants of the two sugarcane varieties that survived at the end of the *in vitro* process. Taking into account these results of the variables evaluated and the importance of thermotherapy, it is possible to reduce the exposure time to 15 days, in order to increase survival and guarantee the elimination of the pathogen. The importance of the combination of treatment is also confirmed. thermal and extraction of apical meristems *in vitro* to make virus elimination efficient.

Keywords: Sugarcane, *in vitro* culture, meristems, growth regulators, molecular diagnosis, thermotherapy, yellow leaf virus, pathogen.

Tabla de Contenido

Introducción	15
Planteamiento del problema.....	18
Justificación	20
Objetivos.....	22
Estado del arte y marco teórico.....	23
Materiales y Métodos.....	33
Resultados y Discusión.....	45
Conclusiones	64
Recomendaciones	66
Referencias bibliograficas.....	67

Lista de tablas

Tabla 1 <i>Clasificación taxonómica</i>	24
Tabla 2 <i>Medios de crecimiento utilizados durante el proceso de cultivo in vitro.</i>	40
Tabla 3 <i>Análisis de individuos muertos por etapa y tratamiento.</i>	45
Tabla 4 <i>Porcentaje total de individuos muertos por tratamiento durante todo el proceso del experimento.</i>	46
Tabla 5 <i>Porcentaje total de individuos muertos por etapa durante todo el proceso del experimento.</i>	46
Tabla 6 <i>Ajuste de medias por mínimos cuadrados para comparaciones múltiples utilizando la corrección de Bonferroni ($P < 0.05$).</i>	48
Tabla 7 <i>Análisis comparativo, tratamientos vs testigo control, mediante la prueba estadística Dunnett.</i>	48
Tabla 8 <i>Análisis de individuos enfermos por etapa y tratamiento.</i>	50
Tabla 9 <i>Ajuste de medias por mínimos cuadrados para comparaciones múltiples utilizando la corrección de Bonferroni ($P < 0.05$).</i>	51
Tabla 10 <i>Análisis comparativo, tratamientos vs testigo control, mediante prueba estadística Dunnett.</i>	51
Tabla 11 <i>Análisis de individuos muertos por etapa y tratamiento.</i>	54
Tabla 12 <i>Porcentaje total de individuos muertos por tratamiento durante todo el proceso del experimento.</i>	55
Tabla 13 <i>Porcentaje total de individuos muertos por etapa durante todo el proceso del experimento.</i>	55

Tabla 14 <i>Agrupamiento Bonferroni para Tratamiento medias de mínimos cuadrados</i> <i>(Alpha=0.05)</i>	56
Tabla 15 <i>Análisis comparativo, tratamientos vs testigo control, mediante la prueba estadística</i> <i>Dunnett</i>	56
Tabla 16 <i>Análisis de individuos enfermos por etapa y tratamiento</i>	59
Tabla 17 <i>Agrupamiento Bonferroni para Tratamiento medias de mínimos cuadrados</i> <i>(Alpha=0.05)</i>	60
Tabla 18 <i>Análisis comparativo, tratamientos vs testigo control, mediante prueba estadística</i> <i>Dunnett</i>	60

Lista de figuras

Figura 1 <i>Caña de azúcar (Saccharum officinarum).</i>	23
Figura 2 <i>Síntoma característico del SCYLV, amarillamiento de la nervadura central.</i>	27
Figura 3 <i>Modelo de Transmisión persistente circulativa y no replicativa de un áfido vector alimentándose de una planta hospedante. circulación interna del virus SCYLV en el floema y en el aparato digestivo del áfido.</i>	28
Figura 4 <i>Meristemo apical y sus partes.</i>	32
Figura 5 <i>Mapa ubicación de Cenicaña.</i>	33
Figura 6 <i>Metodología campo e invernadero. Selección de material en campo (a), corte de tallos previamente diagnosticados con SCYVL (b), extracción de yemas individuales (c), tratamiento térmico (d), siembra de yemas en canastillas (e) trasplante a vasos de polietileno expandido de 6 onzas y germinación en canastillas (f).</i>	34
Figura 7 <i>Cámara de termoterapia PERCIVAL.</i>	36
Figura 8 <i>Corte de tejido foliar para diagnóstico (a), Corte de explantes (b).</i>	37
Figura 9 <i>Lavado de explantes (a), extracción de meristemos (b), meristemo apical (c), cuarto de cultivo in vitro (d).</i>	39
Figura 10 <i>Frascos de vidrio con 25 ml de medio MS1 (a), frascos de vidrio con 35 ml de medio MS2 (b), frascos de vidrio con 35 ml de medio MS3 (c), monitoreo del material vegetal (d).</i>	41
Figura 11 <i>Esquema del proceso de micropropagación convencional de caña de azúcar utilizado en Cenicaña (Barrios et al., 2018).</i>	41

Figura 12 <i>Proceso de endurecimiento y aclimatación. (a), toma de muestras de tejido foliar para diagnóstico de enfermedades (b), siembra del material vegetal en bandejas plásticas (c), trasplante a vasos de polietileno expandido de 6 onzas (d).</i>	42
Figura 13 <i>Representación grafica del porcentaje de mortalidad por etapas y por tratamiento, utilizando la corrección de Bonferroni ($P < 0.05$).</i>	49
Figura 14 <i>Representación grafica del porcentaje de sanidad por etapas y por tratamiento, utilizando la corrección de Bonferroni ($P < 0.05$).</i>	52
Figura 15 <i>Representación grafica del porcentaje de mortalidad por etapas y por tratamiento, utilizando la corrección de Bonferroni ($P < 0.05$).</i>	57
Figura 16 <i>Representación grafica del porcentaje de sanidad por etapas y por tratamiento, utilizando la corrección de Bonferroni ($P < 0.05$).</i>	62

Introducción

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es un cultivo versátil, con capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales, capaz de transformarse en materia prima importante para la fabricación de diversos productos agroindustriales, tales como: azúcar, fertilizantes, papel, bioetanol, generación de energía, entre otros. Entre sus calidades, el respeto por el medio ambiente se refleja en su compromiso con el desarrollo sostenible, trabajando en conjunto con diversas organizaciones en pro de proteger las cuencas hidrográficas, ríos y afluentes, con el fin de optimizar, conservar y restaurar las áreas de influencia de las regiones donde se establece (Rojas, 2021).

La producción de caña de azúcar alcanzó en el 2021, 1.859 millones de toneladas, en un área cosechada de 26 millones de hectáreas, esta producción se concentra principalmente en América con 51,2%, seguido de Asia con 40,8%, África con 5,7%, Oceanía con 2,3%. Los principales países productores son Brasil, India, China continental, Tailandia, Pakistán, México, Colombia, Australia, USA, Indonesia, entre otros (FAOSTAT, 2022). En Colombia los ingenios azucareros Cabaña, Carmelita, Manuelita, María Luisa, Mayagüez, Pichichí, Risaralda, San Carlos, Castilla, Riopaila, Tumaco, Incauca y Providencia, abastecen la producción nacional, con un total de 34 millones de toneladas, en una superficie total cosechada de 241.168 hectáreas (Cenicaña2021), su participación es del 3,7 % del PIB y genera 86.692 empleos directos e indirectos (Núñez, 2019).

En Colombia, los avances en investigación, tecnología e innovación del cultivo de caña de azúcar han ampliado el conocimiento en busca de oportunidades que beneficien la comunidad, la región y el sector productivo (Cenicaña, 2021). Algunos resultados obtenidos de la

agroindustria azucarera, fue la construcción del primer genoma monoploide de un híbrido colombiano de caña de azúcar (CC 01-1940) variedad importante para los estados de selección y desarrollo de variedades elites con mayor precisión y rapidez (Cenicaña, 2021). Otro avance es el desarrollo de la Red IoT (Internet de las cosas) que permite la conectividad eficiente de distintos sensores y actuadores, que brindan una mejor comprensión de los procesos productivos, para la toma de decisiones rápidas y eficientes (Cenicaña, 2021). Finalmente, la sostenibilidad y la diversificación son temas claves de investigación que promueven proyectos que brindan alternativas para la aplicación de tecnologías, el monitoreo hidrológico, protección del ecosistema, reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero, aprovechamiento de los residuos agrícolas, el uso de etanol en motores Diesel para reducir el gasto de combustibles fósiles en labores agrícolas y de transporte (Cenicaña, 2021).

Sin embargo, a pesar del esfuerzo que se realiza en investigación para la óptima producción de caña de azúcar, existen diversos factores no controlables que afectan el cultivo, entre ellos encontramos los factores bióticos y abióticos, aquellos que pueden influir de manera positiva o negativa en su desarrollo. El factor biótico es clave el rendimiento del cultivo, en el encontramos patógenos, difíciles de eliminar y detectar a simple vista, que son afecciones producidas por bacterias y virus, entre los virus se destaca el SCYLV (Guzmán *et al.*, 1995). Este virus actúa de manera sistémica y puede estar asociado a la baja concentración de sacarosa y producción de caña (Avellaneda *et al.*, 2002; Montoya *et al.*, 2020; Bertasello *et al.*, 2021). hace parte de la familia *Luteoviridae*, género *Polerovirus*. se considera una de las principales causas que a nivel mundial reduce significativamente los rendimientos del cultivo, con pérdidas que oscilan entre 60% y 80% (Diaz *et al.*, 2014). Debido a esta problemática, se han realizado

investigaciones para desarrollar tecnologías biotecnológicas que ayuden a la industria agrícola a mejorar la calidad y prevenir la propagación de enfermedades.

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* comprende un grupo de técnicas eficientes que permiten el crecimiento, desarrollo, multiplicación de células, tejidos y órganos vegetales en un medio de composición química definida, se incuban en condiciones ambientales controladas permitiendo regenerar plantas sanas completas libres de patógenos (Mroginski & Roca, 1991). Las primeras investigaciones realizadas en caña de azúcar para la micropropagación *in vitro* inician en 1961 en Hawái, convirtiéndose en una alternativa rápida y precisa para el establecimiento del cultivo para la producción de compuestos o la obtención de cultivos más sanos y con características genéticas específicas deseadas (Israel & Pinto, 2012).

En el Centro de Investigación de la Caña de Azúcar (CENICANÑA), el cultivo de tejidos vegetales se está implementando desde 1991, gracias a las investigaciones realizadas por Moreno (1991), en donde encontró que los tratamientos térmicos de agua caliente y termoterapia combinados con el cultivo *in vitro* de meristemos apicales es suficiente para la obtención de plantas sanas libres de patógenos. Sin embargo, durante el proceso de termoterapia que se realiza durante 21 días a una temperatura de 41°C (Moreno, 1991), se ha encontrado que puede haber pérdidas en la calidad de los meristemos, que se traducen en disminución de la viabilidad y en el incremento de los costos de producción.

Por lo anterior, con el presente trabajo se evaluó el efecto de diferentes tiempos de termoterapia sobre la presencia del virus de la hoja amarilla (SCYLV) y la sobrevivencia de plantas de caña de azúcar de las variedades CC 01-1940 y CC 12-2120 durante el proceso de cultivo *in vitro*.

Planteamiento del problema

Los métodos de cultivo de tejidos *in vitro* vienen creciendo en el marco productivo y como instrumento para la investigación científica (Niubó et al., 2004). La multiplicación de caña de azúcar por el sistema de cultivo *in vitro* en Cenicaña, se está implementando desde 1991 para la obtención de plantas libres de patógenos y el establecimiento de semilleros sanos (Moreno, 1991). Sin embargo, Teniendo en cuenta que los tejidos vegetales iniciales provienen del campo, la probabilidad de contaminación por patógenos es muy amplia, siendo necesario el uso de metodologías que garanticen la sanidad del material vegetal (Niubó et al., 2004). Los procesos de cultivo *in vitro* contemplan diversas metodologías eficientes para la descontaminación del material vegetal, dentro de estos procesos, la termoterapia es un paso vital para minimizar la reproducción del SCYLV y obtener plantas de meristemas libres de este patógeno, debido a que el ácido nucleico que lleva la información genética viral está protegido del ataque de las enzimas degradantes por una envoltura que consta de muchas subunidades de proteínas, que a temperaturas elevadas debilitan los enlaces entre estas subunidades, abriendo temporalmente agujeros para el ataque de las nucleasas, inactivando el virus y reduciendo su concentración (Panta & Golmirzaie, 2016).

Otra razón de implementación radica por la competencia entre las células del huésped que están constante división y las partículas del virus que transitan por lugares de síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, lo cual conduce desequilibrio entre la síntesis y la degradación de las partículas virales. (Panta & Golmirzaie, 2016). Sin embargo, durante este proceso, que se realiza durante 21 días a una temperatura de 41°C (Moreno, 1991), hay pérdidas en la calidad de los meristemas, que se traducen en disminución de la viabilidad y en el incremento de los costos

de producción. Bajo el supuesto de que la reproducción del virus puede detenerse a tiempos en termoterapia inferiores (10 y 15 días) al utilizado actualmente (21 días), se evaluó la sobrevivencia, calidad y sanidad de meristemos durante los pasos del proceso de cultivo *in vitro*. Los resultados se compararán con el tiempo de termoterapia convencional y se seleccionará el tiempo o la condición en la que se obtengan el mayor número de plantas en invernadero libres de patógenos (tratamiento con mayor sobrevivencia y sanidad).

Pregunta de Investigación

La multiplicación de caña de azúcar por sistema convencional en cultivo *in vitro*, se usa para obtener plantas libres de patógenos y establecer semilleros sanos. sin embargo, existen enfermedades sistémicas causadas por virus difíciles de erradicar, como es el caso del virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar SCYLV, que afecta la concentración de sacarosa y producción de caña.

¿Al disminuir el tiempo en cámara de termoterapia utilizado actualmente en el proceso de cultivo *in vitro*, es posible obtener una mayor cantidad de plantas libres de SCYLV?

Hipótesis

La disminución de los tiempos de incubación en cámara de termoterapia favorecerá la viabilidad y producción de plantas libres de SCYLV de las variedades CC 01-1940 y CC 12-2120 de caña de azúcar.

Justificación

La caña de azúcar (*Saccharum* spp.) es un cultivo de importancia económica mundial, representa el 3,7 % del PIB a nivel nacional, genera 286.692 empleos directos e indirectos (Núñez, 2019), siendo el motor de la economía del Valle del Cauca. La producción de azúcar, panela, compost, bioetanol y energía eléctrica, son algunos de los derivados que se obtienen del cultivo. La caña de azúcar es afectada por diversos microorganismos patógenos, entre los cuales está el virus de la hoja amarilla (SCYLV), de género *Polerovirus* y familia *Luteoviridae*. Este patógeno infecta el cultivo de caña de azúcar a nivel global, el principal vector es el pulgón *Melanaphis sacchari* que actúa de manera persistente y circulativa (Avellaneda *et al.*, 2002; ElSayed *et al.*, 2015; Montoya *et al.*, 2020;). Se han reportado pérdidas significativas de rendimiento de azúcar y peso del tallo debidas a esta enfermedad, en Brasil se reportan pérdidas del 50% (Lockhart & Cronje, 2000), Luisiana entre 14% y 11% (Grisham *et al.*, 2001), Florida con 14 % (Rassaby *et al.*, 2004), Tailandia con 11% y 28% (Lehrer *et al.*, 2008), En Colombia la variedad CC 84-75 presento una disminución de 1,2 toneladas de caña por hectárea y 0,21 toneladas de azúcar por hectáreas menos por cada 1% de infección (Victoria *et al.*, 1998, Rangel *et al.*, 2002).

Un manejo asertivo de SCYLV radica en la prevención mediante la producción de plantas provenientes de cultivo *in vitro*, método eficaz para la eliminación de patógenos sistémicos, sin embargo, para la producción *in vitro*, se someten las plantas a un tratamiento térmico, que consiste en someter las plantas a 41°C durante 21 días en una cámara de termoterapia (Moreno, 1991), proceso que puede disminuir la viabilidad del meristemo, órgano que se utiliza para la multiplicación in-vitro. A razón de lo anterior y con miras de determinar si

un menor tiempo de termoterapia mantiene la sobrevivencia y la sanidad de las plantas de caña de azúcar, se evaluará el efecto de diferentes tiempos de termoterapia (10 y 15 días) sobre la presencia del virus de la hoja amarilla (SCYLV) y la sobrevivencia de plantas de las variedades CC 01-1940 y CC 12-2120.

Objetivos

Objetivo general

Determinar si un menor tiempo de termoterapia mantiene la sobrevivencia y sanidad de plantas de caña de azúcar afectadas con el virus de la hoja amarilla (SCYLV).

Objetivos específicos

Evaluar la sobrevivencia de las plantas de caña de azúcar sometidas a dos tiempos de termoterapia.

Evaluar la presencia de virus de la hoja amarilla (SCYLV) en las plantas de caña de azúcar durante los procesos de cultivo *in vitro*.

Determinar cuál tiempo de termoterapia evaluado fue el mejor comparado con el protocolo convencional utilizado en Cenicaña.

Estado del arte y marco teórico

El origen de la caña de azúcar no se conoce con exactitud, pero se cree que es originaria de la región que comprende parte de la India, China, Nueva Guinea y zonas cercanas, ya que es ahí en donde se encuentra el mayor porcentaje de especies (Ruiz, 1995). Su introducción al continente americano fue por Cristóbal Colón en 1493 en la isla de República Dominicana y Haití, y se extendió hacia Brasil, Cuba, Puerto Rico, México, Perú, entre otros (Ramos, 2005). En 1538 Llegó a Colombia por la zona caribeña (Ciudad de Cartagena de Indias) por Pedro Heredia y se introdujo en el Valle del Cauca (municipio de Yumbo) en 1541 por Sebastián de Belalcázar (Ramos, 2005).

Figura 1

Caña de azúcar (Saccharum officinarum).



Fuente. Blanco, 2022.

Taxonomía

Tabla 1

Clasificación taxonómica.

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Embryophita siphonogama</i>
Subdivisión	<i>Angiospermae</i>
Clase	<i>Monocotyledoneae</i>
Orden	<i>Glumiflorae</i>
Familia	<i>Gramineae</i>
Tribu	<i>Andropogonae</i>
Subtribu	<i>Saccharae</i>
Genero	<i>Saccharum</i>
Especie	<i>Saccharum spp.</i>

Fuente. Ruiz, 1995.

En el valle geográfico del río Cauca el área sembrada de caña de azúcar actualmente es de 241,168.53 hectáreas aproximadamente (Cenicaña, 2021), siendo una región privilegiada que cuenta con las condiciones agroambientales favorables para el desarrollo óptimo del cultivo, que sumada con los avances tecnológicos es líder en productividad a nivel mundial. La agroindustria de la caña representa el 3,7 % del PIB a nivel nacional, generando 286,692 empleos directos e indirectos (Núñez, 2019), siendo el motor de la economía del valle del Cauca, la producción de

azúcar, panela, compost, bioetanol y energía eléctrica, son algunos de los derivados que se obtienen del cultivo. En promedio, entre 2016 y 2020, de acuerdo con cifras de la Organización Internacional del Azúcar (OIA), Colombia ocupó el puesto 14 entre los mayores productores mundiales, pero con una participación de solo 1,3% de la producción mundial. En el caso de las exportaciones ocupó el puesto 12 con el 1,1% del comercio mundial de azúcar (Asocaña, 2020-2021).

La caña de azúcar actualmente sembrada en Colombia corresponde al género *Saccharum*, provenientes de hibridaciones introducidas de otros países (Osorio, 2007). Las variedades Cenicaña Colombia (CC) son producidas con el fin de generar resistencia a las enfermedades Roya café, Roya naranja, Carbón y Mosaico. Son seleccionadas para diferentes zonas agroambientales, un caso de éxito es la variedad CC 01-1940 que fue desarrollada para el ambiente húmedo, en 1999 consecuencia de un policruzamiento, fue sembrada en estado I y posteriormente fue seleccionada en 2001 para el estado II (Cenicaña, 2013), convirtiéndose en la variedad de mayor área sembrada en Colombia con aproximadamente 83,575.94 hectáreas, representando el 35.3 % del área (Cenicaña, 2022). teniendo un promedio de producción de 118 TCH (Toneladas de caña por hectárea), 13.41 TAH (Toneladas de azúcar por hectárea y un rendimiento del 11.39%), es resistente a enfermedades de Carbón, Roya café y Mosaico, es susceptible a roya naranja y presenta altos niveles de incidencia del SCYLV (17.7%) (Cenicaña, 2022). Otra de las variedades promisorias es la CC 12-2120, con aproximadamente 598.21 hectáreas, representando el 0.3 % del área, variedad que se encuentra en pruebas regionales que promete ser una alternativa rentable para el sector, ya que se ha destacado significativamente para las zonas humedad, con alta productividad, rendimiento y resistencia a enfermedades (Cenicaña, 2022).

Existen diversos factores negativos que afectan la producción del cultivo de la caña de azúcar tales como, El clima, el suelo y aspectos biológicos. Dichas condiciones limitan el desarrollo óptimo del cultivo y generan pérdidas económicas. Los aspectos biológicos que afectan significativamente el cultivo son las enfermedades, entre estas encontramos afecciones producidas por hongos, bacterias y virus, entre los virus se destaca el SCYLV (Guzmán *et al.*, 1995).

Virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar SCYLV

El virus de la hoja amarilla es una enfermedad sistémica de importancia económica que afecta el cultivo de caña de azúcar, está asociada a la baja concentración de sacarosa y producción de caña (Avellaneda *et al.*, 2002, Montoya *et al.*, 2020, Bertasello *et al.*, 2021). Esta enfermedad es causada por el *Sugarcane yellow leaf virus*, SCYLV sigla en inglés, hace parte de la familia *Luteoviridae*, género *Polerovirus*. Es considerado una de las principales causas bióticas a nivel mundial que reduce significativamente los rendimientos del cultivo, reflejando pérdidas que varían entre 60% y 80% (Diaz *et al.*, 2014). El impacto fisiológico de esta infección viral inhibe la exportación de asimilados, ya sea por la falta de sacarosa o por un bloqueo en el paso del flujo del tubo criboso (ElSayed *et al.*, 2015), su sintomatología característica es el amarillamiento de la nervadura central de la hoja, necrosis del ápice, expansión progresiva a toda la lámina foliar y acumulación de sacarosa en el floema (**Figura 2**), es diseminado por semilla vegetal infectada y por los vectores *Melanaphis sacchari* Zehntner, *Rhopalosiphum maidis* Fitch, *Rhopalosiphum ufiabdominalis* Sasaki y *Sipha flava* Forbes (Hemiptera: Aphididae) de manera persistente, circulativa y no replicativa (Avellaneda, 2002; Diaz *et al.*, 2014; Montoya *et al.*, 2020) (**Figura 3**).

Figura 2

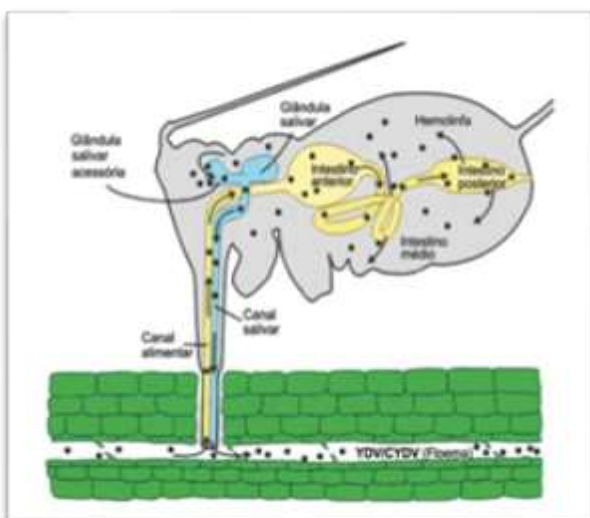
Síntoma característico del SCYLV, amarillamiento de la nervadura central.



Fuente. Cenicaña, 1999.

Figura 3

Modelo de Transmisión persistente circulativa y no replicativa de un áfido vector alimentándose de una planta hospedante. Circulación interna del virus SCYLV en el floema y en el aparato digestivo del áfido.



Fuente. Galindo, 2015.

Los virus son difíciles de eliminar debido a su rápida replicación e invasión de la región infectada, afectando todas las etapas de la expresión génica de esta. Existen tres métodos utilizados para la eliminación del SCYLV, mediante cultivo de tejidos, termoterapia y quimioterapia, siendo estas últimas dos las que menos éxito han tenido en la erradicación del virus, sin embargo la combinación de cualquiera de estas dos metodologías con el cultivo de tejidos meristemáticos han demostrado resultados satisfactorios que se atribuyen a la distribución desigual del virus en los tejidos de los primordios foliares (ElSayed *et al.*, 2015).

Las temperaturas elevadas minimizan la concentración del virus en la planta, generando competitividad celular del huésped que se divide rápidamente y sus partículas que están en diferentes lugares de síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, lo cual origina un desbalance entre la síntesis y degradación de las partículas del virus. Otra explicación es que los ácidos nucleicos del virus están protegidos a los ataques enzimáticos degradantes por unidades de proteínas, y las elevadas temperaturas debilitan y permiten la degradación de las nucleasas, la inactividad del virus y la disminución en su carga viral (Panta & Golmirzaie, 2016).

Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales está definido como una serie de técnicas que buscan el crecimiento óptimo de plantas o secciones de estas libre de patógenos, con medios de cultivo artificiales y en condiciones controladas de luz, humedad relativa y temperatura. A mediados del siglo XX el cultivo de tejidos tuvo un desarrollo acelerado gracias a las investigaciones que permitieron el uso de medios de cultivo suplementados con reguladores de crecimiento sintéticos y el progresivo manejo fenotípico y genotípico de las plantas madre (Suárez, 2020).

En 1962 tuvo lugar el primer cultivo *in-vitro* de caña de azúcar realizado por Nickell, partiendo de la medula del parénquima, logrando la inducción de raíces y diferentes órganos (Gillaspie & Teakle, 1989, Moreno, 1991). El cultivo *in vitro* de meristemas apicales, es una alternativa eficiente en los procesos de mejoramiento ya que el material vegetal se puede multiplicar con mayor velocidad acortando los tiempos de desarrollo de variedades (Lee, G. 1986, Moreno 1991).

La termoterapia puede alterar la síntesis viral y detiene la translocación, en donde la región libre de virus del meristemo se desarrolla haciendo más factible la limpieza, el éxito de la termoterapia depende de la capacidad de resistencia que tenga el tejido para aguantar largos periodos de altas temperaturas que ayudan a inactivar el virus, sin afectar su desarrollo (CIAT, 1982; Roca, *et al.*, 1991).

La micropropagación de plantas es una tecnología que consiste en la producción de genotipos vegetales (clones) de manera aséptica y en condiciones ambientales controladas, su aplicación ha contribuido en el avance de la biotecnología, ya que ofrece la posibilidad de rescatar

plantas a partir de tejido vegetal, conocer el comportamiento de los medios de cultivo, obtener plantas por métodos alternativos de embriogénesis y la producción masiva de plantas a partir de meristemas apicales y axilares siendo los métodos más utilizados en la micropropagación comercial moderna (Suárez, 2020).

El proceso de micropropagación de plantas de caña de azúcar, se realiza a partir del cultivo de meristemas apicales, estos órganos son diferenciados y determinados, contienen la información genética necesaria para producir nuevas células, favoreciendo la diferenciación de tejidos y la perpetuación de su genotipo parental, la producción de plantas a partir de meristemas es una de las técnicas de cultivo de tejidos más utilizadas comercialmente, debido a la estabilidad genética y solidez en la multiplicación masiva de plantas sanas libres de patógenos (Suárez, 2020).

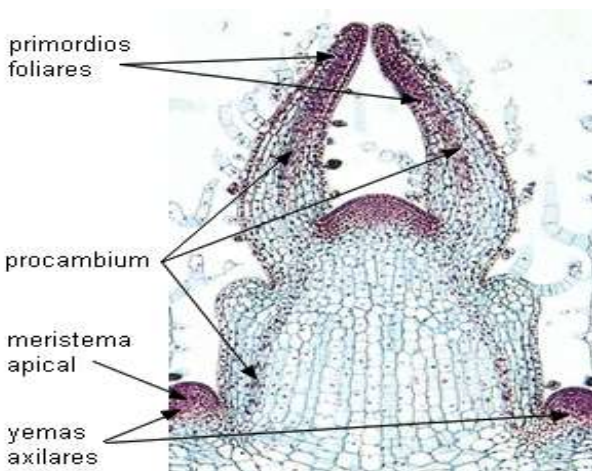
Los medios de cultivo utilizados para la propagación son una mezcla de diversos componentes. Sus cantidades varían de acuerdo con las características y proceso morfogénico del cultivo a propagar. Los medios de cultivo funcionan generalmente como sustrato y fuente energética para el desarrollo óptimo de la especie a desarrollar, los componentes utilizados son: agua destilada o desionizada, minerales, carbohidratos o fuente de energía, vitaminas, reguladores de crecimiento y mecanismo de soporte (Agar, Phytigel) (Suárez, 2020).

Los vectores de contaminación son los que transportan los microorganismos patógenos al cultivo *in vitro*, entre los más relevantes están el material vegetal, el ambiente y el operario. La eliminación de contaminantes sistémicos en plantas utilizando métodos convencionales es casi imposible, ya que los virus se mueven a través de los haces vasculares principalmente (Suárez, 2020).

El cultivo de meristemas apicales para la obtención de plantas libre de patógenos, combinado con la termoterapia son métodos efectivos para la eliminación de enfermedades causada por virus, ya que existe la premisa de que aislando los primordios foliares externos se obtendría tejido vegetal con carencia de estos conductos que son los que permiten la rápida replicación e invasión de la región infectada (**Figura 4**) (Suárez, 2020). Es un método viable ampliamente desarrollado para la obtención de clones fenotípica y genotípicamente idénticos a sus progenitores (Moreno, 1991).

Figura 4

Meristemo apical y sus partes.



Fuente. Gonzalez & Arbo, 2019.

Los métodos de indexación más utilizados para el diagnóstico del SCYLV son RT-PCR (Transcripción Reversa de PCR), RT-qPCR (quantitive Real Time-Polymerasa Chain Reaction), TBIA (tissue blot immunoassay) y ELISA. basadas en pruebas moleculares, debido a su alta sensibilidad y confiabilidad, facilitan la identificación de los contaminantes presentes (Suárez, 2020).

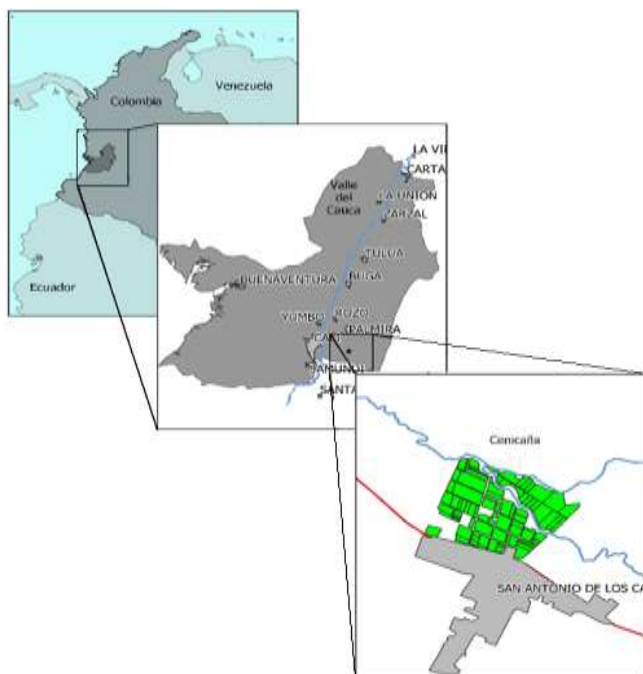
Materiales y Métodos

Localización del experimento

El trabajo se desarrolló en la Estación Experimental del Centro de Investigación de la Caña de Azúcar, CENICAÑA (EESA), localizada en el corregimiento de San Antonio de los Caballeros, municipio de Florida Valle del Cauca, a 3° 21' de latitud norte, 76° 18' de longitud oeste y a una altura sobre el nivel del mar de 1024 m. La temperatura media anual en este sitio es 23 °C, la precipitación promedio anual es de 1135 mm y la humedad relativa es de 77% (Cenicaña, 2014) (**Figura 5**).

Figura 5

Mapa ubicación de Cenicaña.



Fuente. Área geomática Cenicaña, 2014.

Material vegetal

Para la obtención de las plantas, se realizó el corte de tallos de las variedades CC 01-1940 y CC 12-2120 previamente diagnosticados para SCYLV en el Laboratorio Servicio Diagnóstico de Enfermedades de Cenicaña, se llevaron al invernadero donde se extrajeron las yemas individuales con la herramienta Cenizalla® desarrollada en el centro de investigación. Las yemas se sometieron a pre-tratamiento térmico en agua caliente a 50°C durante 10 minutos, seguido de un periodo de reposo de 8 a 12 h a temperatura ambiente y un tratamiento en agua caliente a 51°C durante una hora, para las enfermedades bacterianas raquitismo de la soca y escaldadura de la hoja (Victoria *et al.*, 1995). Las yemas se llevaron a germinación en canastillas plásticas con sustrato de ceniza de bagazo, se trataron con una mezcla de fungicida a una concentración de 2.5 cm/L (Azoxystrobin y Tebuconazole) + insecticida 1.5 cc/l (Tiametoxam y Lambdacihalotrina), se cubrieron con el sustrato y se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (\pm 25°C). y humedad relativa 80%. Aproximadamente a los 21 días después de la siembra, las plantas germinadas se trasplantaron a vasos de poliestireno (icopor) expandido de 6 onzas con suelo pasteurizado y se llevaron a condiciones de invernadero durante 28 días (**Figura 6**). El riego se realizó diariamente hasta llevar el sustrato a capacidad de campo (Moreno, 1991).

Figura 6

Metodología campo e invernadero. Selección de material en campo (a), corte de tallos previamente diagnosticados con SCYVL (b), extracción de yemas individuales (c), tratamiento térmico (d), siembra de yemas en canastillas (e) trasplante a vasos de poliestireno (icopor) expandido de 6 onzas y germinación en canastillas (f).



a. Selección de material en campo



b. Corte de tallos previamente diagnosticados con SCYLV



c. Extracción de yemas individuales



d. Tratamiento térmico



e. Siembra de yemas en canastillas



f. Trasplante a vasos de icopor y germinación en canastillas

Fuente. Autoría propia, 2023.

Detección de SCYLV

Se evaluó la presencia de virus de la hoja amarilla (SCYLV) en cada una de las plantas del estudio antes y después de ser ingresadas a la cámara de termoterapia (diferentes tiempos de incubación) al final del proceso de cultivo in vitro y tres meses después de establecidas en invernadero, mediante la técnica de RT-PCR siguiendo el protocolo descrito por (Ángel et al., 2001).

Tratamientos

A los 15 días del trasplante a vasos de poliestireno expandido de 6 onzas, se seleccionaron las plantas de acuerdo con su desarrollo para homogenizar las unidades de observación y se identificaron con un número. A los 28 días las plantas positivas al virus de la hoja amarilla (SCYLV) se llevaron a cámara de termoterapia en una incubadora PERCIVAL a una temperatura establecida de $41^{\circ}\text{C} \pm 1$ y un fotoperiodo de 12 horas (**Figura 7**) y se incubarán de acuerdo con los siguientes tratamientos.

Figura 7

Cámara de termoterapia PERCIVAL.



Fuente. Cámara de termoterapia Cenicaña.

Tratamiento 0: Tiempo en condiciones controladas de invernadero ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), 21 días (Testigo absoluto).

Tratamiento 10: Tiempo en cámara de termoterapia de 10 días.

Tratamiento 15: Tiempo en cámara de termoterapia de 15 días.

Tratamiento 21: Tiempo en cámara de termoterapia convencional, 21 días (testigo).

Durante el tratamiento de termoterapia, las plantas se regaron diariamente con agua corriente dentro de la cámara.

Las plantas de los tratamientos 10, 15 y 21, se llevaron a la cámara de termoterapia, donde permanecieron los días propuestos a evaluar (tratamientos) a $41^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y un fotoperiodo de 12 horas. Después de concluido el proceso de termoterapia, se cortaron las plantas desde la base y se tomó una hoja de cada planta como muestra para determinar la presencia del SCYLV (**Figura 8**), mediante la técnica (RT-PCR) (Ángel et al., 2001).

Figura 8

Corte de tejido foliar para diagnostico (a), Corte de explantes (b).



a. Corte de tejido foliar para diagnostico



b. Corte de explantes

Fuente. Autoría propia, 2023.

Proceso de cultivo *in vitro*

Los explantes se llevaron al laboratorio de fitopatología en donde se realizó la desinfección del material vegetal, mediante un lavado con abundante agua potable para eliminar las impurezas y restos de tierra, luego se sumergieron en una solución de Tego al 4%, y se agitaron en un Shaker Orbital Genie (Scientific Industries) durante 15 min, se lavaron con agua potable hasta eliminar completamente todo residuo de Tego. Posteriormente, los explantes se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 3 % durante 10 min, se lavaron con agua potable hasta eliminar todo residuo de hipoclorito de sodio y se llevaron a la cámara de flujo laminar previamente desinfectada con etanol al 70%, donde se dejaron sumergidos en agua destilada estéril (Moreno, 1991).

Después de la desinfección del material vegetal, los explantes se colocaron dentro de la cámara de flujo laminar previamente desinfectada con etanol al 70%, las herramientas y equipos usados para la extracción de meristemas fueron limpios y estériles, estos están conformados por pinzas, bisturí, hojas de bisturí # 11, cajas Petri, esterilizador y un estereoscopio que se ingresaron después de la desinfección (Barrios *et al.*, 2018).

La extracción se realizó manualmente retirando los primordios foliares hasta llegar al meristemo apical que tiene un tamaño aproximado de 0.2 mm (Barrios *et al.*, 2018). La siembra se realizó en viales con 5 ml de medio MS1, se selló con vinipel y se rotulo con la fecha de extracción, nombre de la variedad y número de muestra. Posteriormente se trasladó al cuarto de cultivo *in vitro* donde estuvieron en oscuridad total durante 10 días, con una temperatura $22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad relativa 50% -70% para su rápida elongación (**Figura 9**). Después de concluido el

tiempo de oscuridad se llevaron los explantes a la luz dentro del mismo cuarto, con un fotoperiodo 16:8 (16 h/luz y 8 h/oscuridad) (Barrios *et al.*, 2018).

Figura 9

Lavado de explantes (a), extracción de meristemos (b), meristemo apical (c), cuarto de cultivo in vitro (d).



a. Lavado de explantes



b. Extracción de meristemos



c. Meristemo apical



d. Cuarto de cultivo *in vitro*.

Fuente. Autoría propia, 2023.

Pasados 30 días se evaluó la sobrevivencia, los meristemos vivos se colocaron en frascos de vidrio con 25 ml de medio MS1 (**Tabla 2**) durante 30 días, para que estos continúen con su elongación y fortalecimiento, 30 días después se evaluó sobrevivencia y los explantes vivos se colocaron en frascos de vidrio con 35 ml de medio MS2 (**Tabla 2**), para continuar su proceso de multiplicación. Después de concluido el tiempo de multiplicación se evaluó nuevamente

sobrevivencia y los explantes vivos se colocaron en frascos de vidrio con 35 ml de medio MS3 (**Tabla 2**) durante 30 días para la inducción de raíces, luego de concluido el tiempo de enraizamiento se evaluó sobrevivencia y sanidad de los explantes. El traslado de los explantes en cada paso de cambio de frasco y medio se realizó en cabina de flujo laminar siguiendo los cuidados de asepsia descritos anteriormente, se marcaron los frascos (fecha de extracción), nombre de la variedad, número de muestra y fecha de realización del proceso. El seguimiento del material vegetal durante las etapas de elongación, multiplicación y enraizamiento se realizó periódicamente y se evaluó la presencia de contaminación o muerte del tejido se descartó inmediatamente del cuarto de cultivo *in vitro* y se tomó nota del número de muestra y sus causas de eliminación (**Figura 10 y 11**).

Tabla 2

Medios de crecimiento utilizados durante el proceso de cultivo in vitro.

Componentes/dosis	Elongación (MS1)	Multiplicación (MS2)	Enraizamiento (MS3)
	1Lt	1Lt	1Lt
Sales MS y vitaminas	4.43 gr	4.43 gr	4.43 gr
Sacarosa	25 gr	25 gr	25 gr
Mynositol	100 mg	100 mg	100 mg
Ácido cítrico	100 mg	100 mg	100 mg
Carbón activado	10 mg	10 mg	10 mg
ANA (500mg/100mL)			1 ml
GA3 (10mg/100mL)	1 ml		
IBA (1mg/100mL)	1 ml		
BAP (30mg/100mL)		1 ml	
KIN (1mg/100mL)		1 ml	1 ml
pH	5.7 – 5.8		

Fuente. Barrios et al., 2018.

Figura 10

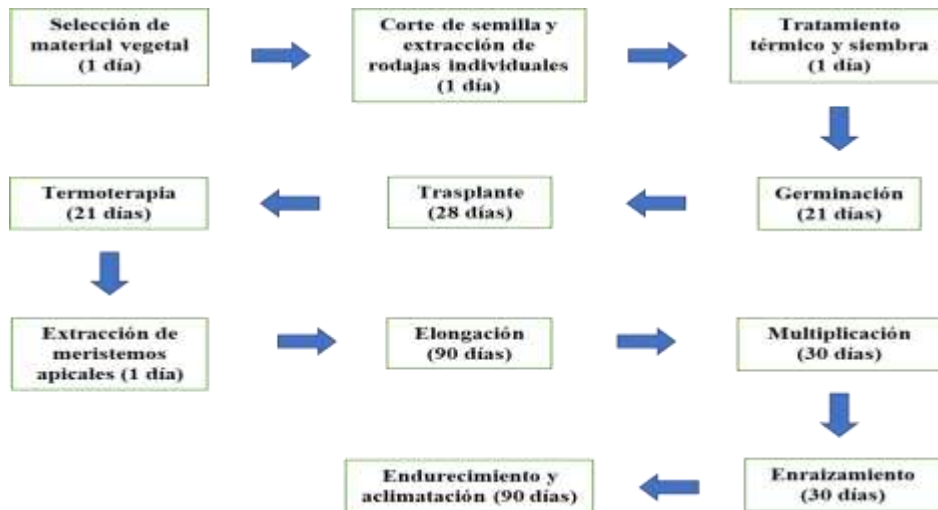
Frascos de vidrio con 25 ml de medio MS1 (a), frascos de vidrio con 35 ml de medio MS2 (b), frascos de vidrio con 35 ml de medio MS3 (c), monitoreo del material vegetal (d).



Fuente. Autoría propia, 2023.

Figura 11

Esquema del proceso de micropropagación convencional de caña de azúcar utilizado en Cenicaña (Barrios et al., 2018).



Fuente. Autoría propia, 2023.

Por último las plantas formadas a partir de los explantes de cada tratamiento, se trasladaron al invernadero a condiciones ambientales controladas de temperatura ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). y humedad relativa 80%. La siembra se realizó en bandejas plásticas utilizando turba como sustrato para su óptima aclimatación, pasado 15 días se trasplantaron a vasos de poliestireno expandido de 6 onzas con suelo pasteurizado, los explantes se individualizaron y se cortó la parte apical con una tijera desinfectada con yodo o amonio cuaternario (1%), se dejaron durante 3 meses para su óptimo desarrollo, pero antes de la siembra se tomó una muestra de la parte foliar de los explantes que sobrevivieron al final de las etapas mencionadas anteriormente, se realizó un diagnóstico de enfermedades para SCYLV mediante RT-PCR (Ángel et al., 2001). Después de tres meses nuevamente se tomó muestras de las plantas finales y se realizó de nuevo un diagnóstico de enfermedades para SCYLV mediante RT-PCR con el fin de asegurar la limpieza total del material vegetal (**Figura 12**).

Figura 12

Proceso de endurecimiento y aclimatación. (a), toma de muestras de tejido foliar para diagnóstico de enfermedades (b), siembra del material vegetal en bandejas plásticas (c), trasplante a vasos de polietileno expandido de 6 onzas (d).



Fuente. Autoría propia, 2023.

Diseño experimental

Se evaluaron dos tratamientos correspondientes a dos tiempos de permanencia en cámara de termoterapia (10 y 15 días) y se compararon con un testigo absoluto que corresponde al tiempo de permanencia que se utiliza en el protocolo actual de Cenicaña.

Se evaluaron 39 plantas por tratamiento de la variedad CC 01-1940, distribuidas de manera aleatoria (DCA) dentro de la cámara de tratamiento térmico.

Se evaluaron 27 plantas por tratamiento de la variedad CC 12-2120, distribuidas de manera aleatoria (DCA) dentro de la cámara de tratamiento térmico.

Durante el proceso de cultivo in vitro, se evaluó el número de plantas muertas y contaminadas en las etapas de:

- Elongación del meristemo en frasco vial, medio MS1.
- Elongación del meristemo en frasco compota, medio MS1.
- Multiplicación de la planta frasco mayonesa, medio MS2.
- Enraizamiento de la planta frasco mayonesa, medio MS3.
- Endurecimiento en invernadero.

La distribución de las unidades de observación se realizó de manera aleatoria en la estantería del cuarto de cultivo in vitro.

Se realizó un análisis exploratorio en donde se describe el comportamiento de los individuos evaluados en el estudio, con el fin de observar el porcentaje de mortalidad y sanidad que se presenta por etapa y tratamiento.

Para el análisis de diferencias significativas para mortalidad y sanidad, se define un modelo lineal generalizado mixto con variable de respuesta binaria, efecto fijo (tratamiento) y

efecto aleatorio (etapa). También se realizaron pruebas de comparaciones múltiples (Bonferroni y Dunnett) con el fin de capturar todos los posibles pares que presentan diferencias estadísticas significativas en las dos variables de interés (mortalidad y sanidad), estos análisis se ejecutaron con el programa SAS Enterprise Guide, Versión 8.1.

Resultados y Discusión

Mortalidad CC 01-1940

En la **Tabla 3** se observa el porcentaje de mortalidad que se presentó en el estudio por etapa y tratamiento, se infiere que la mayor mortalidad se vio reflejada en las etapas de multiplicación y enraizamiento. El tratamiento que mayor porcentaje de mortalidad obtuvo fue **T15** y la etapa con mayor mortalidad fue la de enraizamiento y (**Tabla 4 y Tabla 5**).

Tabla 3

Análisis de individuos muertos por etapa y tratamiento.

Etapas/Tratamiento	Conteo de individuos vivos	Porcentaje de individuos muertos	Número de individuos muertos
Previo a termoterapia	156	0%	0
Posterior a termoterapia			
T0	39	0%	0
T10	39	0%	0
T15	39	3%	1
T21	39	0%	0
Total	156	1%	1
Elongación 1			
T0	39	3%	1
T10	39	0%	0
T15	38	8%	3
T21	39	3%	1
Total	155	0%	0
Elongación 2			
T0	38	0%	0
T10	39	8%	3
T15	35	3%	1
T21	38	8%	3
Total	150	5%	7
Multiplicación			

T0	38	8%	3
T10	36	17%	6
T15	34	35%	12
T21	35	46%	16
Total	143	26%	37
Enraizamiento			
T0	35	37%	13
T10	30	27%	8
T15	22	73%	16
T21	19	53%	10
Total	106	44%	47
Aclimatación			
T0	22	5%	1
T10	22	55%	12
T15	6	17%	1
T21	9	11%	1
Total	59	25%	15
Invernadero	15	0%	0

Tabla 4

Porcentaje total de individuos muertos por tratamiento durante todo el proceso del experimento.

Tratamiento	Porcentaje de individuos muertos
T0	16.1%
T10	25.9%
T15	30.4%
T21	27.6%

Tabla 5

Porcentaje total de individuos muertos por etapa durante todo el proceso del experimento.

Etapas	Porcentaje de individuos muertos
Previo a termoterapia	0.00%
Posterior a termoterapia	0.89%
Elongación 1	4.46%
Elongación 2	6.25%
Multiplicación	33.04%
Enraizamiento	41.97%
Aclimatación	13.39%
Invernadero	0.00%

Los menores valores en la mortalidad se encontraron en el tratamiento T0 seguido del tratamiento T10, estos tratamientos difirieron estadísticamente de los tratamientos T15 y T21 respectivamente. Los resultados mostraron que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de termoterapia (T10, T15 y T21), entre los pares T0 vs T15 y T0 vs T21, si se encontraron diferencias estadísticas significativas y el tratamiento T15 fue el que mayor mortalidad media obtuvo (**Tabla 6**). Estos resultados fueron similares cuando se realizó el análisis con la prueba de Dunnett, (**Tabla 7**). Investigaciones realizadas por Kassanis (1957) y Quak (1977), llevadas a cabo con huéspedes y sus virus han demostrado que el tratamiento de plantas con temperaturas elevadas (termoterapia) reduce la concentración y replicación del virus en la planta. Siendo la termoterapia un paso vital para la eliminación del virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar. Skiada *et al.*, (2009) combinaron termoterapia con cultivo de meristemos *in vitro* para la erradicación del virus 1 asociado con el enrollamiento de la hoja de la uva (GLRaV-1) en donde sometieron a un tratamiento térmico durante 6 semanas con una temperatura alterna de 40 °C/37 °C (día/noche), la supervivencia reportada es del 53 % de los brotes tratados con calor, una regeneración del 56 % de las puntas de los brotes y un 91 % y un 74 % de plantas libres de (GLRaV-1). AlMaarri *et al.*, (2012) sometieron plantas de papa con el virus PVY a tratamiento térmico durante 40 días a una temperatura constante de 37 °C, seguido de un cultivo *in vitro* de meristemos apicales (0,1–0,3 mm), los resultados de supervivencia oscilaron alrededor del 88 % de los brotes tratados y 75–81 % de plantas libres de virus en dos cultivares de papa, y las puntas de brotes más grandes redujeron las frecuencias de erradicación del virus.

Tabla 6

Ajuste de medias por mínimos cuadrados para comparaciones múltiples utilizando la corrección de Bonferroni ($P < 0.05$).

LS-medias con la misma letra no son significativamente diferente.			
Tratamiento	Prob. mortalidad		
T15	87%		A
T21	79%		A
T10	74%	B	A
T0	46%	B	

Tabla 7

Análisis comparativo, tratamientos vs testigo control, mediante la prueba estadística Dunnett.

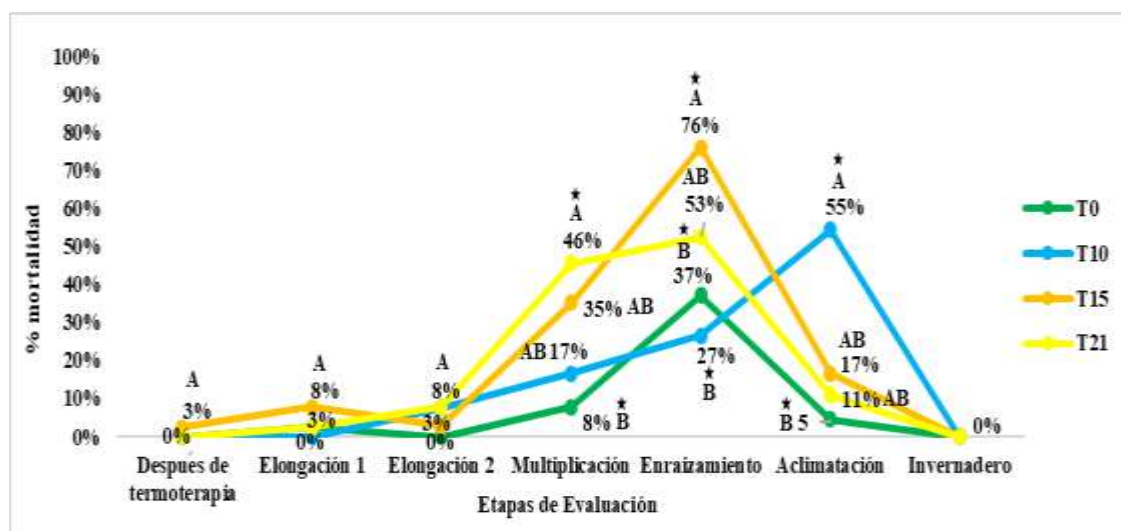
Diferencias de Tratamiento medias de mínimos cuadrados							
Ajuste para comparaciones múltiples: Dunnett-Hsu							
Tratamiento	Tratamiento	Estimación	Error estándar	DF	t valor	Pr > t 	Adj P
T10	T0	0.7476	0.3442	957	2.17	0.0301	0.0747
T15	T0	1.5398	0.355	957	4.34	<.0001	<.0001
T21	T0	1.3508	0.3549	957	3.81	0.0002	0.0004

Finalmente Se realizo un analisis de mortalidad por etapas, utilizando la corrección de Bonferroni ($P < 0.05$), en donde se observan diferencias significativas en las etapas de multiplicacion y enraizamiento, etapas donde se presenta la mayor tasa de mortalidad. Evidencia suficiente para continuar explorando las posibles causas de este fenomeno que afecta de manera negativa la sobrevivencia de las plantas (**Figura 13**). Resultados opuestos encontraron Lozoya *et al.*, (1982) para la erradicación del virus del mosaico del tabaco mediante termoterapia y cultivo in vitro de puntas de brotes, en donde sometieron plantas a un tratamiento térmico a 40 °C/6 °C (día/noche) durante 15 días. Las plantas tratadas térmicamente crecieron tan bien como el control (25 °C/6 °C), en las hojas de las plantas tratadas con calor la infectividad del virus aumentó en

todos los tratamientos, TMV se detectó en todas las noticias desarrolladas recientemente. Las puntas de los brotes que se desarrollaron durante los tratamientos de temperatura alterna se aislaron del tabaco infectado con TMV tratado y se cultivaron *in vitro* para la regeneración de plántulas. Como resultado, todas las plántulas regeneradas seguían infectadas con TMV.

Figura 13

Representación gráfica del porcentaje de mortalidad por etapas y por tratamiento, utilizando la corrección de Bonferroni ($P < 0.05$).



En la **Figura 13** se observa el comportamiento de los tratamientos durante todo el proceso del experimento, en donde se puede evidenciar algunas etapas críticas del proceso, siendo las etapas de multiplicación y enraizamiento las que mostraron un alto porcentaje de mortalidad y diferencias significativas entre tratamientos, siendo T15 y T21 (testigo) los que mayor porcentaje de mortalidad presentan en ambas etapas de evaluación.

Sanidad CC 01-1940

En la **Tabla 8** se observa el porcentaje y numeros de individuos enfermos que se presentó en el estudio por etapa y tratamiento, se infiere que la mayor sanidad se vio reflejada en los tratamientos T15 y T21, posiblemente debido a que fueron los tratamientos que estuvieron el mayor tiempo en la camara de termoterapia (15-21 dias). Tambien se observa que el T0 (testigo absoluto) fue el unico tratamiento que presento individuos enfermos en todas las etapas evaluadas en el estudio. Aunque el tratamiento de 10 dias (T10) presento individuos enfermos despues de camara de termoterapia, se observa que en la etapa 6 y 7 no muestran individuos afectados por el virus, teniendo en cuenta que las plantas del tratamiento T10 en las etapas 2, 3, 4 y 5 fueron sometidas a limpieza utilizando el cultivo de meristemos apicales *in vitro*, corroborando la eficiencia de la extraccion de meristemos para la eliminación de virus (**Tabla 8**).

Tabla 8

Análisis de individuos enfermos por etapa y tratamiento.

Etapas/Tratamientos	Porcentajes de individuos enfermos	Número de individuos enfermos
Antes de termoterapia	100%	156
T0	25%	39
T10	25%	39
T15	25%	39
T21	25%	39
Después de termoterapia	100%	13
T0	77%	10
T10	23%	3
T15	0%	0
T21	0%	0
Aclimatación	100%	5
T0	100%	5
T10	0%	0

T15	0%	0
T21	0%	0
Invernadero	100%	3
T0	100%	3
T10	0%	0
T15	0%	0
T21	0%	0

Los resultados mostraron que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de termoterapia para la variable de interés. Los tratamientos con menor incidencia del virus de la hoja amarilla (SCYLV) fueron T15 y T21, sin embargo fueron los que mayor porcentaje de mortalidad obtuvieron (**Tabla 9**). Estos resultados fueron similares cuando se realizó con la prueba de Dunnett, en donde los análisis comparativos de los tratamientos (T10, T15 y T21) vs nuestro testigo (T0) no muestran diferencias significativas estadísticas para la variable de respuesta (**Tabla 10**).

Tabla 9

Ajuste de medias por mínimos cuadrados para comparaciones múltiples utilizando la corrección de Bonferroni ($P < 0.05$).

LS-medias con la misma letra no son significativamente diferente.		
Tratamiento	% plantas sanas	
T21	100%	A
T15	100%	A
T10	94%	A
T0	77%	A

Tabla 10

Análisis comparativo, tratamientos vs testigo control, mediante prueba estadística Dunnett.

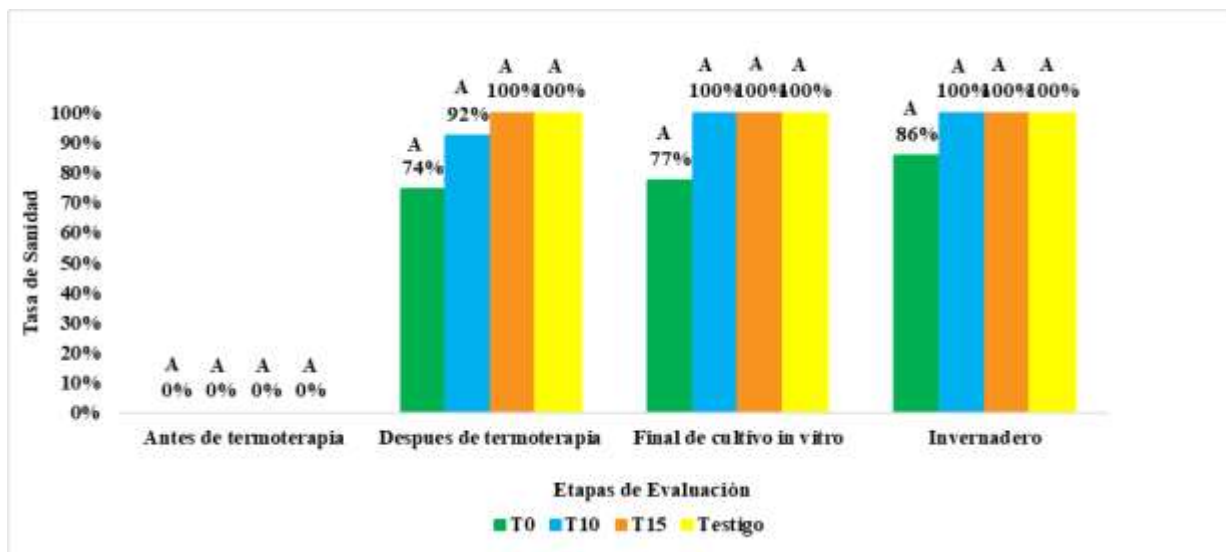
Diferencias de Tratamiento medias de mínimos cuadrados
Ajuste para comparaciones múltiples: Dunnett-Hsu

Tratamiento	Tratamiento	Estimación	Error estándar	DF	t valor	Pr > t	Adj P
T10	T0	-2.3243	1.0355	169	-2.24	0.0261	0.077
T15	T0	-4.0078	2.522	169	-1.59	0.1139	0.3
T21	T0	-4.0078	2.1116	169	-1.9	0.0594	0.166

Por ultimo para la variable sanidad, se observa de manera descriptiva un analisis por etapas, utilizando la corrección de Bonferroni ($P < 0.05$), en donde no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en ninguna de las etapas evaluadas durante el proceso de cultivo *in vitro*. Demostrando nuevamente la eficacia de la combinacion de termoterapia con el cultivo de meristemas apicales para la eliminacion del virus de la hoja amarilla (SCYLV) (**Figura 14**). Peteira et al. (1992) reportaron entre 96-100% de saneamiento al combinar el cultivo de ápices con termoterapia (50° C durante 10 minutos). En investigaciones realizadas por Victoria *et al.*, (1999), encontraron que el tratamiento de las yemas de caña de azúcar tratadas con agua caliente a 51°C por 1 hora, la termoterapia de las plántulas germinadas por 15-21 días con aire caliente a 41°C y la combinación con el cultivo *in vitro* de meristemas apicales, permitió obtener un 95% de plantas libres de patógenos. Fitch *et al.*, 2001, Observaron que la extracción de meristemas de 0,3-0,7 mm combinada con la organogénesis indirecta por callo resultó en una eliminación del 100% del virus. Solo uno de cada 10 cultivares mostró 20% de infección, completamente excluido en otros.

Figura 14

Representación gráfica del porcentaje de sanidad por etapas y por tratamiento, utilizando la corrección de Bonferroni ($P < 0.05$).



Mortalidad CC 12-2120

En la **Tabla 11** se observa el porcentaje de mortalidad que se presentó en el estudio por etapa y tratamiento, se infiere que la mayor mortalidad se vio reflejada en las etapas de elongación 1 y elongación 2. El tratamiento que mayor porcentaje de mortalidad obtuvo fue **T3** y la etapa con mayor mortalidad fue la de elongacion 1 y (**Tabla 12 y Tabla 13**).

Tabla 11

Análisis de individuos muertos por etapa y tratamiento.

Etapas/Tratamiento	Conteo de individuos vivos	Porcentaje de individuos muertos	Número de individuos muertos
Previo a termoterapia	108	0%	0
Posterior a termoterapia	108	0%	0
Elongación 1			
T0	27	0%	0
T10	27	0%	0
T15	27	85%	23
T21	27	100%	27
Total	108	46%	50
Elongación 2			
T0	27	33%	9
T10	27	15%	4
T15	4	75%	3
Total	58	28%	16
Multiplicación			
T0	18	72%	13
T10	23	96%	22
T15	1	100%	1
Total	42	86%	36
Enraizamiento			
T0	5	0%	0
T10	1	0%	0

Tabla 12

Porcentaje total de individuos muertos por tratamiento durante todo el proceso del experimento.

Tratamiento	Porcentaje de individuos muertos
T0	5.9%
T10	16.2%
T15	38.2%
T21	39.7%

Tabla 13

Porcentaje total de individuos muertos por etapa durante todo el proceso del experimento.

Etapa	Porcentaje de individuos muertos
Antes de termoterapia	0.00%
Después de termoterapia	0.00%
Elongación 1	73.53%
Elongación 2	23.53%
Multiplificación	2.94%
Enraizamiento	0.00%

Los menores valores en la mortalidad se encontraron en el tratamiento T0, seguido del tratamiento T10, estos tratamientos difirieron estadísticamente de los tratamientos T15 y T21 respectivamente. Los resultados mostraron que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de termoterapia (T10, T15 y T21), entre los pares T0 vs T15 y T0 vs T21, si hubo diferencias estadísticas significativas y el tratamiento T21 fue el que mayor mortalidad obtuvo (**Tabla 14**). Estos resultados fueron similares cuando se realizó el análisis con la prueba de Dunnett, en donde los análisis comparativos de los tratamientos (T10, T15 y T21) vs nuestro testigo control (T0), se encontraron diferencias significativas entre los mismos tratamientos pares T15 vs T0 y T21 vs T0 que se observaron en la prueba de Bonferroni (**Tabla 15**).

Tabla 14

Agrupamiento Bonferroni para Tratamiento medias de mínimos cuadrados (Alpha=0.05).

LS-medias con la misma letra no son significativamente diferente.			
Tratamiento	Prob. mortalidad		
T21	100%		A
T15	100%	B	A
T10	96%	B	C
T0	81%		C

Tabla 15

Análisis comparativo, tratamientos vs testigo control, mediante la prueba estadística Dunnett.

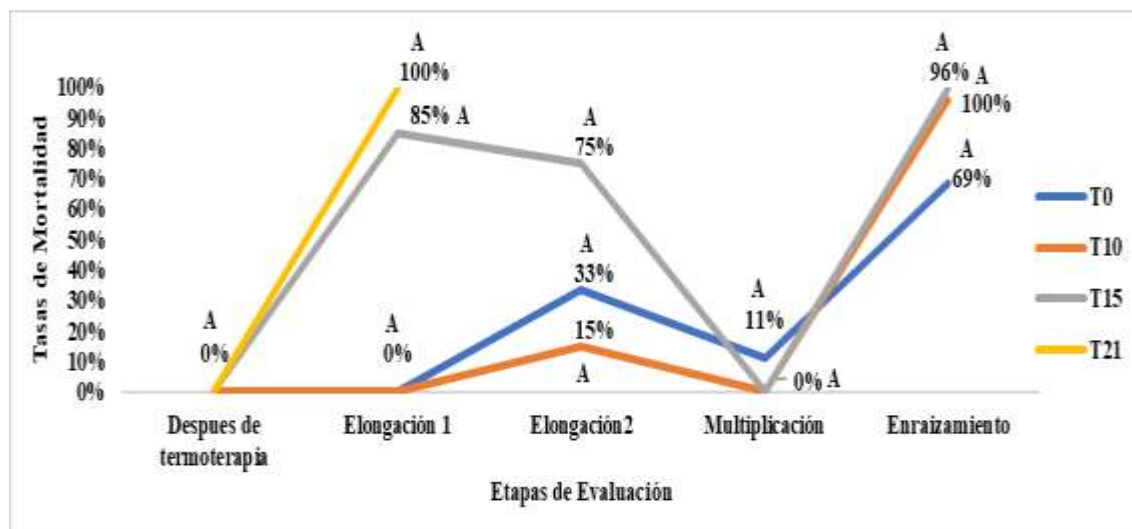
Diferencias de Tratamiento medias de mínimos cuadrados							
Ajuste para comparaciones múltiples: Dunnett-Hsu							
Tratamiento	Tratamiento	Estimación	Error estándar	DF	t valor	Pr > t 	Adj P
T10	T0	0.1025	0.3163	460	0.32	0.746	0.977
T15	T0	0.8979	0.3279	460	2.74	0.0064	0.018
T21	T0	1.0033	0.3307	460	3.03	0.0025	0.007

Finalmente Se realizo un analisis de mortalidad por etapas, utilizando la corrección de Bonferroni ($P < 0.05$), en donde no se observan diferencias significativas entre tratamientos, consecuencia de la alta tasa de mortalidad que presento la variedad en todos los tratamientos evaluados en cada una de las etapas, otras causas serian la susceptibilidad de la variedad a la temperatura y el poco unidades de observacion del estudio que no permitieron evaluar los tratamientos en todas las etapas del proceso de cultivo *in vitro*. Para evitar conclusiones erroneas y teniendo en cuenta que la tasa de mortalidad promedio es de 94%, se recomienda realizar un estudio con un mayor numero de unidades observaciones, para disminuir el error de la muestra y aumentar la precision de los resultados (**Figura 15**). Para variedades susceptibles se puede recurrir como una alternativa de prevencion, usar material vegetal resistente y sano, que puede

ser obtenido por una combinación de termoterapia y cultivo de meristemas apicales, medida que fue demostrada efectiva por Smith y Rott, (2004). Siguiendo la metodología de generación de callos friables y embriogénicos, en donde se regeneraron plantas enteras, sin embargo, al evaluar la presencia del virus, se detectó en el 5% de ellas. Esto pudo ser debido según Kevers et al. (2004), a la hiperhidricidad ya que esta implica problemas de diferenciación celular, por lo que los brotes no pueden tener un desarrollo morfo-fisiológico normal.

Figura 15.

Representación gráfica del porcentaje de mortalidad por etapas y por tratamiento, utilizando la corrección de Bonferroni ($P < 0.05$).



En la **Figura 15** se observa el comportamiento de los tratamientos durante todo el proceso del experimento, en donde no se presentan diferencias significativas entre tratamientos, sin embargo se puede evidenciar que los tratamientos T15 y T21 (testigo) son los mas afectados por la termoterapia, siendo estos los que presentaron los mas altos porcentajes de mortalidad en las etapas de elongacion 1 y 2, perdiendo en su totalidad el 100% de las plantas. Estos resultados

nos muestran que la variedad CC 12-2120 es susceptible a las altas temperaturas ya que en todos los tratamientos se presentó altos porcentajes mortalidad.

Sanidad CC 12-2120

En la **Tabla 16** se observa el porcentaje y numeros de individuos enfermos que se presentó en el estudio por etapa y tratamiento, se infiere que la mayor sanidad se vio reflejada en los tratamientos T15 y T21, posiblemente debido a que fueron los tratamientos que estuvieron el mayor tiempo en la camara de termoterapia (15-21 dias). Tambien se observa que el T0 (testigo absoluto) fue el unico tratamiento que presento individuos enfermos en todas las etapas evaluadas en el estudio. Aunque el tratamiento de 10 dias (T10) presentó individuos enfermos despues de camara de termoterapia, se observa que en la etapa de enraizamiento no muestran individuos enfermos, teniendo en cuenta que las plantas del tratamiento T10 fueron sometidas a limpieza utilizando el cultivo de meristemos apicales *in vitro*, corroborando la eficiencia de la extraccion de meristemos para la eliminación del virus (**Tabla 16**).

Tabla 16

Análisis de individuos enfermos por etapa y tratamiento.

Etapas/Tratamiento	Porcentajes de individuos enfermos	Número de individuos enfermos
Antes de termoterapia	100%	108
T0	25%	27
T10	25%	27
T15	25%	27
T21	25%	27
Después de termoterapia	100%	34
T0	41%	14
T10	56%	19
T15	0%	0
T21	3%	1
Enraizamiento	100%	1
T0	100%	1

T10	0%	0
------------	----	---

Los resultados mostraron diferencias significativas entre tratamientos para la variable de interés. los tratamientos con menor incidencia del virus de la hoja amarilla (SCYLV) fueron T15 y T21, sin embargo fueron los que mayor porcentaje de mortalidad obtuvieron (**Tabla 17**). Estos resultados fueron similares cuando se realizó con la prueba de Dunnett, en donde los análisis comparativos de los tratamientos (T10, T15 y T21) vs (T0) donde se observan diferencias significativas estadísticas entre los tratamientos T0 vs T15 y T0 vs T21 para la variable de respuesta (**Tabla 18**).

Tabla 17

Agrupamiento Bonferroni para Tratamiento medias de mínimos cuadrados (Alpha=0.05).

LS-medias con la misma letra no son significativamente diferente.			
Tratamiento	Estimación		
T21	50%		A
T15	48%		A
T10	28%	B	A
T0	16%	B	

Tabla 18

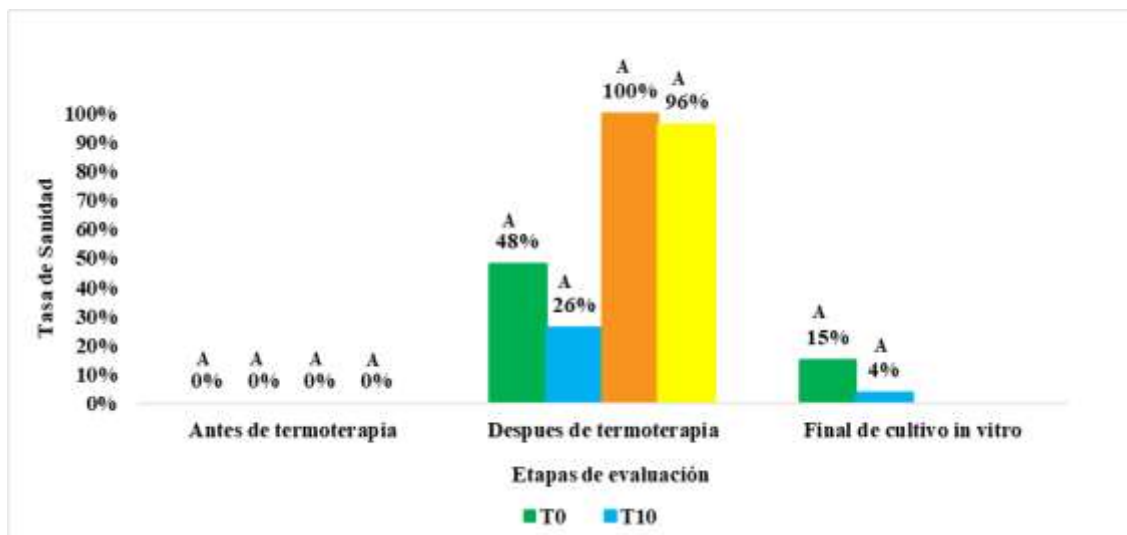
Análisis comparativo, tratamientos vs testigo control, mediante prueba estadística Dunnett.

Diferencias de Tratamiento medias de mínimos cuadrados							
Ajuste para comparaciones múltiples: Dunnett-Hsu							
Tratamiento	Tratamiento	Estimación	Error estándar	DF	t valor	Pr > t 	Adj P
T10	T0	-0.727	0.4642	218	-1.57	0.1188	0.2785
T15	T0	0.9045	0.3959	218	2.28	0.0233	0.0617
T21	T0	0.8303	0.396	218	2.1	0.0372	0.0959

Por último para la variable sanidad, se observa de manera descriptiva un análisis por etapas, utilizando la corrección de Bonferroni ($P < 0.05$), en donde no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en ninguna de las etapas evaluadas durante el proceso de cultivo *in vitro*. Demostrando nuevamente la eficacia de la combinación de termoterapia con el cultivo de meristemas apicales para la eliminación del virus de la hoja amarilla (SCYLV) (**Figura 16**). Una de las principales ventajas de estos sistemas *in vitro* es que utilizan células como unidad básica, por lo que pueden tratar fácilmente un gran número de individuos con agentes específicos de selección, lo que brinda la oportunidad de ahorrar tiempo y esfuerzo en condiciones ambientales controladas (García *et al.*, 2002). La termoterapia es ineficiente si no es combinada con el cultivo de meristemas apicales *in vitro*. Resultados obtenidos por Burbano, C., & Garces, F. (2009), en donde evaluaron el efecto de la aplicación de herramientas de cultivo de tejidos para la eliminación de virus, mostraron que la termoterapia sola no es eficiente para la indexación del virus, observándose incidencias del 86.7% y 90% respectivamente en las plantas que fueron tratadas con solo termoterapia y agua caliente, en comparación a las plantas de los tratamientos de reinducción de callos embriogénicos, cultivo de meristemas apicales y plantas tratadas con productos químicos, que mostraron incidencias del virus (SCYLV) menores de 7%. El empleo de sistemas combinados ha logrado la eliminación del RSD y también de otros patógenos sistémicos de la caña de azúcar, como la bacteria causante de la escaldadura foliar y el Virus del mosaico de la caña de azúcar (Matsuoka *et al.*, 1988; Sordi y Tokeshi, 1988; Matos, 2002; McGuire *et al.*, 2009).

Figura 16

Representación gráfica del porcentaje de sanidad por etapas y por tratamiento, utilizando la corrección de Bonferroni ($P < 0.05$).



Ramgareeb et al. (2010), demostraron que una combinación de tratamiento térmico y el cultivo de meristemos apicales es eficiente para la obtención de plantas libres del virus, ya que existe la premisa de que aislando los primordios foliares externos se obtendría tejido vegetal con carencia de estos conductos que son los que permiten la rápida replicación e invasión de la región infectada, la eficacia de esta técnica depende de la susceptibilidad de la variedad utilizada, el tipo de patógeno, el inóculo y el tamaño del tejido meristemático utilizado (Snyman *et al.*, 2011).

Los cambios en el tamaño de los meristemos extraídos pueden afectar la eficiencia en la indexación del virus (Garces *et al.*, 2013). Las técnicas de cultivo *in vitro* empleadas en este estudio demostraron la efectividad para la obtención de plantas libres de patógenos, la conservación *in vitro* de germoplasma y en la obtención de clones resistentes a enfermedades. El empleo de la alternancia de temperaturas a yemas aisladas y la termoterapia lograron un saneamiento del 100% de la escaldadura foliar. En la conservación *in vitro* variedades nobles de

S. officinarum en peligro de extinción, los mejores resultados se obtuvieron empleando un medio de crecimiento mínimo y una temperatura de incubación de 15°C. En las técnicas de cultivo in vitro de tejido, la mayor pérdida del material vegetal ocurre en los primeros pases P0 y P1 por el establecimiento del cultivo. A partir de P2 esto disminuye, pues la planta se ha formado completamente. Por esa razón se evaluó el porcentaje de supervivencia en P0 y P1. A pesar de los controles en las condiciones experimentales, no fue posible disminuir las pérdidas ocasionadas en esta etapa. Las excesivas manipulaciones del material vegetal (manejo de instrumentos, calor excesivo, corte inadecuado del meristemo) pudieran ser algunas de las causas de las pérdidas, estas pérdidas en la supervivencia no pueden vincularse a una reducción de la masa seca, la cual está asociada a la presencia de brotes hiperhídricos (Arellano *et al.*, 2015), este fenómeno que no ha sido dilucidado completamente ha sido descrito como un desorden multicausal (Quiala *et al.*, 2012). los ápices meristemáticos han sido empleados para la micropropagación de la caña de azúcar. Victoria *et al.*, (1998) lograron eliminar a la bacteria causante del Raquitismo al utilizar tratamientos combinados de hidrotermoterapia previo al cultivo de meristemas.

Conclusiones

En CC 01-1940 para la variable mortalidad, el tratamiento T0 y T10 permiten un mayor porcentaje de sobrevivencia, en comparación a los tratamientos T15 y T21 que mostraron los mas altos porcentajes de mortalidad en el estudio. sin embargo el objetivo del estudio ademas de aumentar la sobrevivencia tambien busca garantizar la sanidad, los tratamientos T0 y T10 aunque presentan los menores porcentaje de mortalidad, esto no garantiza la eliminacion del patogeno al final del proceso de cultivo *in vitro*.

Para la variable sanidad, en CC 01-1940 los resultados mostraron los menores valores de incidencia en los tratamientos T15 y T21 (testigo), logrando un 0% de incidencia en las plantas que sobrevivieron al final del proceso *in vitro*. Los analisis no muestran diferencias significativas, sin embargo el tratamiento T0 fue el unico que presento plantas enfermas al final del experimento.

En CC 12-2120 para la variable mortalidad, no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos, mostrando altos porcentajes de mortalidad en todas las etapas del proceso, posiblemente es una variedad susceptible a las altas temperaturas, lo que dificultad su propagacion por cultivo de tejidos vegetales. Sin embargo debido a que el porcentaje de mortalidad es tan alto en todos los tratamientos, es necesario realizar un experimento con un mayor numero de observaciones a fin de disminuir el error de la muestra y validar los resultados obtenidos en este estudio.

Para la variable sanidad, en CC 12-2120, los resultados mostraron los menores valores de incidencia en el tratamiento T15, con 0% de incidencia de las plantas evaluadas. Los analisis no

muestran diferencias significativas, sin embargo los tratamientos T0 y T10 fueron los únicos que presentaron plantas enfermas al final del experimento.

Teniendo en cuenta los resultados de las variables evaluadas y la importancia de la termoterapia, es posible reducir el tiempo de exposición a 15 días, a fin de aumentar la sobrevivencia y garantizar la eliminación del patógeno.

Se confirmó la importancia de la combinación de tratamiento térmico y la extracción de meristemas apicales *in vitro* para hacer eficiente la eliminación del virus.

Recomendaciones

Validar los resultados con nuevas variedades CC.

Teniendo en cuenta los altos porcentajes de mortalidad que se presento en las etapas de multiplicacion y enraizamiento, se recomienda evaluar las causas y efectos de este fenómeno, realizando ensayos con diferentes concentraciones u otros complementos, para aumentar la sobrevivencia y evitar el cuello de botella dentro del proceso *in vitro*, a fin de garantizar una alta producción de plantas libres de patogenos.

Para el caso de la variedad CC 12-2120 es necesario realizar un estudio con un mayor número de unidades de observacion, ya que no fue posible evaluar las plantas de todos los tratamientos, debido a los altos porcentajes de mortalidad que se presentaron a lo largo del experimento. Lo que se busca es disminuir el error de la muestra y aumentar la precision de los resultados.

Evaluar otras variables que influyen en la sobrevivencia de las plantas, como son medios, temperaturas, fotoperiodo, humedad relativa, entre otros.

Referencias bibliograficas

Acosta, Y. C., Cadavid, M., Ángel, J. C., Victoria, J.I. y Ángel, C.A. (2014). Diagnóstico de las enfermedades SCYLV, RSD y LSD en caña de azúcar (*Saccharum* spp.) mediante PCR en tiempo real: SCYLV, Informes trimestrales del Área de Fitopatología, Programa de Variedades, CENICAÑA 2013. 2014.

AlMaarri K, Massa R, AlBiski F. Evaluación de algunas terapias y cultivo de meristemas para eliminar el potyvirus Y de la papa de las plantas de papa infectadas. *Biotecnología vegetal*. 2012; 29 :237–243. doi: 10.5511/biotecnología vegetal.12.0215a.

Ángel, J C., Ángel, F. y Victoria, J. I. (2001). Diagnóstico molecular de razas del virus del síndrome de la hoja amarilla en caña de azúcar (SCYLV) en Colombia. *Fitopatología colombiana*. Vol. 25. No. 1. p. 19- 22.

Asocaña. (2021). Informe anual 2020-2021. Recuperado de: <http://www.asocana.org>

Arellano-Litardo, A. C., Korneva, S. B., Fischer, F. C., Tola, N. A., Ramos-Leal, M., & Pincay-Flores, A. (2015). Obtención de semilla biotecnológica de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) de alta calidad genética y fitosanitaria en el Ecuador. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(1), 101-110.

Avellaneda, M. C., Ángel, J. C. y Victoria, J. I. (2002). Resistencia de diferentes variedades de caña de azúcar (Híbrido de *Saccharum* sp.) al virus del síndrome de la hoja amarilla

(Sugarcane Yellow Leaf virus, Luteovirus) empleando al áfidos *Melanaphis sacchari* como vector de transmisión. Trabajo de Grado Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana- Cenicaña. 58 p.

Barrios R., Garcés F., Victoria K., Ángel J. C., Sarria, Y. Guerrero H., (2018). Sistemas de inmersión temporal: una nueva alternativa para la multiplicación in vitro de semilla sana de caña de azúcar. Congreso Tecnicaña 2018. 5p.

Bertasello, L. C., Sousa, M.; Prado Maluta, NK; Rossini Pinto, L.; Spotti Lopes, J., & Gonçalves, M. (2021). Efecto de Cultivares de Caña de Azúcar Infeccionados con Amarillo de Caña de Azúcar Virus de la hoja (SCYLV) en el comportamiento alimentario y biológico Desempeño de *Melanaphis sacchari* (Hemiptera: Aphididae). <https://doi.org/10.3390/plants10102122>.

Burbano, C., & Garces, F. (2009). 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. Cenicaña. (2021). Informe Anual. 138.
https://www.cenicana.org/pdf_privado/informe_anual/ia_2021/ia2021.pdf

Cenicaña. (2013). CC 01-1940: una opción rentable para ambientes húmedos. Carta Informativa, 8–9. <http://www.cenicana.org/web/ci/item/668-cc-01-1940-una-opcion-rentable-para-ambientes-humedos>

Cenicaña. (23 de noviembre de 2014). Cenicaña. Obtenido de Ruta de acceso a la Estación Experimental Cenicaña: <https://www.cenicana.org/ruta-de-acceso-a-la-estacion-experimental-cenicana/>

Cenicaña. (25 de marzo de 2021). Agroindustria de la caña compartió con Min-agricultura sus avances en ciencia, tecnología e innovación. Obtenido de Cenicaña: <https://www.cenicana.org/agroindustria-de-la-cana-compartio-con-minagricultura-sus-avances-en-ciencia-tecnologia-e-innovacion/>

Cenicaña. (2022). Cenicaña. Recuperado el 27 de septiembre de 2023, de Informe Trimestral 2022, Programa Variedades, Área de Fitopatología: <https://www.cenicana.org/>

Cenicaña. (2022). Informe anual. Valle del Cauca. Cali: Oficina de Comunicaciones Estratégicas. Obtenido de <https://www.cenicana.org/wp-content/uploads/2023/09/ia2022.pdf>

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.

- Donneys, V.L.; Angel, S.J.; y Riascos, O.F. (2021). Servicio de Diagnóstico de Enfermedades, Informe anual enero-diciembre. 2021. CENICAÑA.
- ElSayed, A. I., Komor, E., Boulila, M., Viswanathan, R., & Otero, D. C. (2015). Biology and management of sugarcane yellow leaf virus: an historical overview. *Archives of Virology*, 160(12), 2921–2934. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2618-5>
- FAOSTAT. (23 de diciembre de 2022). Cultivos y productos de ganadería. Obtenido de Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura: <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL/visualize>
- Fitch, M. M. M., Lehrer, A. T., Komor, E., & Moore, P. H. (2001). Eliminación del virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar de plantas de caña de azúcar infectadas mediante cultivo de punta de meristemo visualizado mediante inmunoensayo de transferencia de tejido. *Plant Pathology* 50: 676-680
- Galindo, M. D. M. (2015). Un nuevo virus emergente, ToLCNDV: transmisión, sintomatología y diagnóstico. <https://repositorio.upct.es/bitstream/handle/10317/4648/tfg467.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

García, L.; García, L.; Veitia, N.; Bermúdez, I.; Orellana, P.; Padrón, Y.; Acosta, M. (2002).

Selección in vitro a *Ustilago scitaminea* Syd sobre callos embriogénicos de caña de azúcar.. *Biotecnología Vegetal*. 2. p: 243-244.

Garcés, F., Fiallos, F., Mendoza, J., Silva, E., Castillo, R., Valdez, M., & Viteri, I. (2013).

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. In *Memorias del III Congreso AETA*, Guayaquil-Ecuador. Septiembre (Vol. 18).

Gillaspie, A. G., & Teakle, D. S. (1989). Ratoon stunting disease. *Diseases of sugarcane: major diseases*, 58-80.

González, A. M., & Arbo, M. M. (2019). Tejidos conductores o vasculares. *Botánica*

Morfológica, 303–324. www.biologia.edu.ar/botanica

Grisham MP, Pan YB, Legendre BL, Godshall MA, Eggleston G (2001). Efecto del virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar sobre el rendimiento de la caña de azúcar y la calidad del jugo. *Sugar Tech* 24:434–438

Guzmán, M. L., Angel, J. C., & Victoria, J. I. (1995). Enfermedades de la caña de azúcar en

Colombia. 30 páginas. or 293-265. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/1366>

Lee, T. S. G. (1986). Multiplication of sugarcane by apex culture. Turrialba (IICA).

- Israel, A., & Pinto, Z. (2012). Establecimiento in vitro de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) variedad CP 73-1547. 6–10.
<https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/b6412010-6e5f-4ebb-af53-6084e1eb8913/content>
- Kassanis, B. (1957). El uso del cultivo de tejidos para producir clones libres de virus a partir de variedades de papa infectadas. *Annals of Applied Biology* 45: 422-427.
- Kevers, C., Franck, T., Strasser, R.J., Dommès, J. and Gaspar, T. (2004). Hiperhidricidad de brotes micropropagados: un cambio de estado fisiológico típicamente inducido por estrés. *Cultivo de células, tejidos y órganos vegetales*. 77(2), 181-191
- Lehrer AT, Kusalwong A, Komor E (2008) Alta incidencia del virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar (SCYLV) en plantaciones de azúcar y colecciones de germoplasma en Tailandia. *Aust Plant Dis Notes* 3:89–92
- Lockhart BEL, Cronje´ CPR (2000) Síndrome de la hoja amarilla In: Rott P, Bailey RA, Comstock JC, Croft BJ, Saumtally AS (eds) Una guía para las enfermedades de la caña de azúcar. CIRAD-ISSCT, Montpellier, pp 291–295

- Lozoya-Saldana H, Dawson WO. (1982). Efecto de regímenes alternos de temperatura en la reducción o eliminación de virus en tejidos vegetales. *Fitopatología.*; 72 :1059–1064. doi: 10.1094/Phyto-72-1059.
- Mafla, G., Roa, J., Aranzales, E., & Debouck, D. (2010). Manual De Procedimientos in Vitro Del Germoplasma. In Vitro.
- Moreno B. (1991). Limpieza in vitro de variedades de caña de azúcar. Tesis. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Palmira, Colombia. 76 p.
- Mroginski, L., & Roca, W. M. (1991). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. In *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones* (pp. 20–40). [https://www.exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Cultivo de Tejidos en la Agricultura/capitulo2.pdf](https://www.exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Cultivo%20de%20Tejidos%20en%20la%20Agricultura/capitulo2.pdf)
- Núñez, J. R. (mayo de 2019). Estudio sobre el impacto socioeconómico del sector agroindustrial de la caña en Colombia. Fedesarrollo, No. 70. Obtenido de <http://hdl.handle.net/11445/3776>
- O, Diaz; M, O-Hechaverría; M, Zardón; E, Rodriguez; J, Mesa; Y, Puchades; J, Delgado; F, D. (2014). Distribución del Virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar en Cuba. *Rev. Protección Veg.*, 29(3), 177–184.

- Osorio, G. (2007). Buenas prácticas agrícolas y buenas prácticas de manufactura en la producción de Caña y Panela. In Buenas prácticas agrícolas en la siembra de caña de azúcar y producción de panela (Vol. 52, Issue 5).
https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/18313/43120_50541.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Panta, A., & Golmirzaie, A. (2016). Cultivo de Tejidos para la Eliminación de Patógenos con fines de Producción de Semilla de Papa. April, 1–8.
- Quijala, E., Cañal, M.J., Meijón, M., Rodríguez, R., Chávez, M., Valledor, L., de Feria, M. and Barbón, R. (2012). Respuestas morfológicas y fisiológicas de brotes proliferantes de teca a tratamientos de inmersión temporal y BA. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. (PCTOC), 109(2), 223-234
- Rangel, M. P., Tabares Z., E., Lentini, Z., Tohme M., J., Mirkov, E., Victoria Kafure, J. I., & Angel, F. (2002). Transformación de plantas de caña de azúcar susceptibles al síndrome de la hoja amarilla. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 4(1), 54–60.
<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/30090/30285>
- Ramgareeb, S., Snyman, S.J., Van Antwerpen, T. y Rutherford R.S. (2010). Eliminación de virus y rápida propagación de caña de azúcar libre de enfermedades (*Saccharum* spp. cultivar NCo376) usando cultivo de meristemas apicales. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 100:175-181.

- Ramos, O. G. (2005). Caña de azúcar en Colombia. *Revista de Indias*, 65(233), 49-78. doi:
<https://doi.org/10.3989/revindias.2005.i233.376>
- Rassaby L, Girard J-C, Lemaire O et al (2004) Propagación del virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar en plantas y campos de caña de azúcar en la isla de Reunión. *Plant Pathol* 53:117–125
- Roca, W., Nolt, B., Mafla, G., Roa, J.C. & Reyes, R. (1991). Eliminacion de virus y propagacion de clones en la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) In: Roca, W.M., Mroginski, L.A. (eds.), *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*, pp. 403-421.
- Rojas, D. A. (3 de noviembre de 2021). La Caña de Azúcar, una agroindustria que impulsa el progreso. Obtenido de El País: <https://www.elpais.com.co/contenido/la-cana-de-azucar-una-agroindustria-que-impulsa-al-valle-del-cauca.html>
- Ruiz, F. S. (1995). *Cultivo de la Caña de Azúcar*. (Primera ed.). San Jose, Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia. Obtenido de https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=2wpC1j2AmkAC&oi=fnd&pg=PA3&dq=cultivo+de+ca%C3%B1a+de+az%C3%BAcar+&ots=B1oTGGelvW&sig=DhYQVSijsd3x2ziEmWNbOqH0m_8#v=onepage&q&f=false

- Skiada FG, Grigoriadou K, Maliogka VI, Katis NI, Eleftheriou EP. (2009). Eliminación de Grapevine leafroll-associated virus 1 y Grapevine leafroll-associated virus de la vid cv. Agiorgitiko y una micropropagación de protocolo para la producción masiva de plántulas libres de virus. *J Plant Pathol.*; 91 :177–184.
- Smith GR and Rott P. (2004). Caña de azúcar. Capítulo 22 En: *Virus y enfermedades similares a virus de los principales cultivos en los países en desarrollo.* (G. Loebenstein y G. Thottappilly, eds.) Kluwer Academic Publishers, Países Bajos. pp. 543-565.
- Snyman, S. J.; Meyer, S. G.; Koch, A. C.; Banasiak, M.; Watt, M. P. (2011). aplicaciones del sistema de cultivo in vitro para la producción y mejoramiento de caña de azúcar comercial. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.*, 47. p: 234249.
- Suárez, I. (2020). Cultivo De Tejidos Vegetales. In Fondo editorial, Universidad de Córdoba. <https://repositorio.unicordoba.edu.co/handle/ucordoba/2553>
- Victoria J.I., Guzmán M.L., Angel, J.C. (1995). Enfermedades de la caña de azúcar en Colombia. En: *Cenicaña. El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia, Cali, Cenicaña* 1995. pp. 265-293.
- Victoria, J. I., Garces, F. F., Guzmán, M. L., & Angel, F. (1998). Síndrome de la hoja amarilla en Colombia ScYLV (Sugarcane Yellow Leaf Virus). *Cenicaña*, 3–7.

Victoria, J. I., Guzmán, M. L., Cuervo, E., & Lockhart, B. (1999). Síndrome de la hoja amarilla en Colombia. Cenicaña, N° 7.

https://www.cenicana.org/pdf_privado/serie_divulgativa/sd_07/sd_07.pdf