



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

Tesis para acceder al título de Magister en Ciencias Agropecuarias
Mención: Producción Vegetal

ENFERMEDAD DEL AMARILLAMIENTO EN CAÑAVERALES
DEL NOROESTE ARGENTINO:
DISTRIBUCIÓN, EFECTO EN EL RENDIMIENTO Y
GENOTIPOS VIRALES DE *Sugarcane yellow leaf virus*

Ing. Agr. Florencia Asinari

DIRECTOR: Ing. Agr. (M.Sc) Alejandro M. Rago

CODIRECTOR: Ing. Agr. (Dra.) Eva E. Cafrune

Río Cuarto, marzo 2019

**ENFERMEDAD DEL AMARILLAMIENTO EN CAÑAVERALES DEL
NOROESTE ARGENTINO:
DISTRIBUCIÓN, EFECTO EN EL RENDIMIENTO Y GENOTIPOS
VIRALES DE *Sugarcane yellow leaf virus***

Ing. Agr. Florencia Asinari

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y fecha:.....

Calificación:.....

JURADO

Firma:.....Aclaración:.....

Firma:.....Aclaración:.....

Firma:.....Aclaración:.....

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento al INTA, institución en la cual trabajo, y que mediante una beca de formación me brindó el tiempo y financiamiento necesarios para realizar esta maestría.

A mis directores de tesis, Ing. Agr. (MSc.) Alejandro M. Rago e Ing. Agr. (Dra.) Eva E. Cafrune. Gracias a su dedicación los objetivos planteados en esta tesis fueron alcanzados.

Al tribunal evaluador, Ing. Agr. (M. Sc.) Marcelo Kearney, Ing. Agr. (MSc.) Claudio Odino y Lic. (Dra.) Claudia Nome por el tiempo brindado y sus aportes en el manuscrito.

A la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto, por abrir sus puertas recibíendome con calidez y apoyo.

A los organizadores de la Maestría en Ciencias Agropecuarias; por la dedicación y esfuerzo en acompañar y asesorar a cada uno de sus alumnos.

A los profesores y compañeros con los cuales compartí cada uno de los cursos realizados, por su enseñanza, profesionalidad y por hacerme sentir “como en casa” en mis estadías en Río Cuarto.

A Veronica Trucco; por su apoyo desde los inicios de esta tesis, brindando amistad, compañerismo y estando siempre dispuesta a compartir sus conocimientos ayudando a que esta tesis sea posible.

A Cecilia Luciani, colega, compañera y amiga; por su apoyo profesional en cada instancia académica y por sus consejos que me ayudan cada día a ser mejor persona.

A mis compañeros del INTA, quienes han logrado que los días de trabajo sean divertidos, en especial a Lourdes Villafañe con quien pasé semanas enteras procesando muestras.

A Juan Paredes, Daniel Collino, Ale Rago, Ana Laura Giraudo, Ceci Luciani, Eli Pozzi, Evi Arguello, Vero T, Ceci Perotto, Claudia Nome, Sole De Breuil, Vilma Conci, Paula Venier, Gabi Pittaro, Fanny Guzman, Nathy Marquez, Juanchi Edwards, Javi Barontini. Gracias por estar presentes, brindando apoyo y confianza en momentos difíciles.

A mi familia, por estar siempre presente desde el cariño, la comprensión y la paciencia.

INDICE DE CONTENIDOS

| | |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| ÍNDICE DE TABLAS | vi |
| ÍNDICE DE FIGURAS | viii |
| RESUMEN | xii |
| ABSTRACT | xiii |
| Lista de símbolos y abreviaturas | xiv |
| CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL | 16 |
| Antecedentes | 16 |
| Hipótesis | 24 |
| Objetivo general | 24 |
| Objetivos específicos | 24 |
| CAPÍTULO II: DISTRIBUCION DE SCYLV EN TUCUMÁN, SALTA Y JUJUY | 25 |
| Antecedentes | 25 |
| Objetivo | 35 |
| Materiales y Métodos | 35 |
| Resultados | 40 |
| Discusión | 49 |
| Conclusiones del capítulo | 53 |
| CAPITULO III: GENOTIPOS VIRALES DE SCYLV | 54 |
| Antecedentes | 54 |
| Objetivo | 60 |
| Materiales y Métodos | 60 |
| Resultados | 63 |
| Discusión | 69 |
| Conclusiones del capítulo | 72 |
| CAPITULO IV: EFECTO DE SCYLV EN EL RENDIMIENTO SACARINO | 73 |
| Antecedentes | 73 |

| | |
|--------------------------------------------------------------|-----|
| Objetivo | 81 |
| Materiales y Métodos..... | 81 |
| Resultados | 85 |
| Discusión | 92 |
| Conclusiones del capítulo | 94 |
| CAPÍTULO V: CONSIDERACIONES FINALES..... | 95 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 96 |
| ANEXO I..... | 103 |
| Extracción de ácidos nucleicos totales CTAB modificado | 103 |
| ANEXO II..... | 105 |
| RT-PCR..... | 105 |
| ANEXO III..... | 107 |
| <i>Tissue Blot immunoassay</i> | 107 |
| PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS | 110 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 2 1. Número de lotes (N° lotes), muestras (N° muestras) y muestras sintomáticas (con síntoma) colectadas al azar en las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy durante los años 2015 y 2016. De cada provincia se detallan las variedades muestreadas..... | 36 |
| Tabla 2 2. Detalle de la cantidad de muestras colectadas y lotes muestreados por provincia (columna: total), cantidad de muestras y lotes positivos a SCYLV detallado por provincia (columna: +SCYLV) y cantidad de muestras y lotes negativos a SCYLV por provincia (columna: -SCYLV). El total de muestras y lotes negativos y positivos al virus como el total de muestras colectadas y lotes muestreados se detalla en la última fila en negrita. | 41 |
| Tabla 2 3. Detalle de la cantidad de muestras colectadas y lotes muestreados por variedad (columna: total), cantidad de muestras y lotes positivos a SCYLV detallado por variedad (columna: +SCYLV) y cantidad de muestras y lotes negativos a SCYLV por variedad (columna: -SCYLV). El total de muestras y lotes negativos y positivos al virus como el total de muestras colectadas y lotes muestreados se detalla en la última fila en negrita. | 42 |
| Tabla 2 4. Ponderación de la incidencia de SCYLV en las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy. Por provincia se detallan las variedades muestreadas, la superficie (en ha) ocupadas por cada variedad y el porcentaje de ocupación provincial. El cálculo de Incidencia ponderada (%) surge de la multiplicación de los valores de las columnas nº 4 y 5. | 44 |
| Tabla 2 5. Tabla de contingencia con clasificación cruzada de datos categorizados realizada mediante el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo et al., 2017). Las frecuencias absolutas de la ausencia (0) y presencia (1) de síntomas se muestra en columnas, mientras que las frecuencias absolutas de la ausencia (0) y presencia (1) de SCYLV se muestra en filas. | 45 |
| Tabla 3 1. Descripción de 50 muestras positivas a SCYLV (mediante TBIA) colectadas durante los muestreos 2015 y 2016 en el Noroeste Argentino. | 60 |
| Tabla 3 2. Detalle de la cuantificación de ácidos nucleicos totales obtenidos con el método de CTAB modificado de Doyle y Doyle (1987). Las 50 muestras se identificaron del 1 al 50 y la concentración de ácidos nucleicos se expresó en ng/µl..... | 65 |
| Tabla 3 3. Detalle de las variedades analizadas para la detección de los genotipos BRA-PER, CUB y REU. La tabla especifica el número de muestras analizadas por variedad, y cuantas de ellas presenta cada genotipo en estudio. De cada variedad se detalla el porcentaje de cada genotipo detectado, tomando como 100% el número de muestras colectadas por variedad. Las dos últimas filas muestran el total de cada columna (sumatoria) y el porcentaje (tomando como 100% las 50 muestras analizadas). | 68 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 4 1. Valores de rendimiento sacarino (%) según presencia/ausencia de SCYLV en la variedad LCP 85-384 proveniente del ensayo ubicado en EEA INTA-Famaillá. Para cada atado se detalla peso, lecturas del refractómetro y polarímetro y los valores calculados de Pol jugo, Pol caña y Pureza. | 86 |
| Tabla 4 2. Valores de rendimiento sacarino (%) según presencia/ausencia de SCYLV en la variedad LCP 85-384 proveniente del ensayo ubicado en el Ingenio Ledesma. Para cada atado se detalla peso, lecturas del refractómetro y polarímetro y los valores calculados de Pol jugo, Pol caña y Pureza. | 87 |
| Tabla 4 3. Prueba T para muestras independientes de InfoStat. Comparación de medias según la sanidad de las muestras (SCYLV negativas y SCYLV positivas) en dos poblaciones diferentes según la procedencia (Famaillá y Ledesma). Las variables en estudio fueron: Brix, lectura polarimétrica, pol jugo, pol caña, pureza y rendimiento sacarino. | 89 |
| Tabla 4 4. Cálculo de \$ perdidos/ha ante la merma de t azúcar/ha producidas en muestras SCYLV+ en comparación a las muestras SCYLV- en los ensayos llevados a cabo en EEA INTA-Famaillá y en el Ingenio Ledesma. | 91 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 1. Fases fenológicas del cultivo de caña de azúcar. A. Emergencia y establecimiento de la población inicial de tallos (brotación). B. Crecimiento vegetativo de las cañas y macollaje. C. Periodo de gran crecimiento, donde se determina el rendimiento cultural. D. Maduración del cultivo y definición de la producción de azúcar. Tomado de Romero <i>et al.</i> , 2009. | 17 |
| Figura 1 2. Cadena azucarera en Argentina (producción primaria, etapa industrial y destino). Se muestran los procesos productivos en color celeste, los productos en color gris y la reutilización de subproductos en línea azul punteada. Tomado de Anino y Pizzo, 2016. | 18 |
| Figura 1 3. Tetraedro de la enfermedad. Interrelaciones entre una población de patógenos y una población de hospedantes bajo la influencia del ambiente y el tiempo. Adaptado de Castaño Zapata, 2002. | 19 |
| Figura 1 4. Hojas de caña de azúcar con síntomas característicos de la enfermedad del amarillamiento foliar. La primera y cuarta hoja desde la izquierda, no presentan síntoma. Adaptado de Rott <i>et al.</i> , 2000. | 21 |
| Figura 1 5. Transmisión persistente circulatoria de un áfido vector alimentándose de una planta hospedante. Detalle de la circulación interna del virus SCYLV en el floema y en el aparato digestivo del áfido. (Adaptada de http://www.apsnet.org/edcenter/illglossary)..... | 21 |
| Figura 2 1. Superficie destinada a la producción de caña de azúcar y producción de azúcar en Argentina (Fuente: Anino y Pizzo, 2016) | 25 |
| Figura 2 2. Superficie plantada con caña de azúcar en Tucumán (2018). (Fuente: Benedetti y Morales, 2018) | 26 |
| Figura 2 3. Detección de SCYLV en distintas zonas de producción de caña de azúcar. Los recuadros rojos y rosas indican la presencia de SCYLV y los recuadros blancos la ausencia del mismo. Los números dentro de los recuadros indican el año de cuando se hizo la prueba en búsqueda de la presencia/ausencia de SCYLV. (Adaptado de Komor <i>et al.</i> 2010)..... | 28 |
| Figura 2 4. Departamentos y lotes muestreados en las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy durante los años 2015 y 2016. Mapas elaborados con el programa ArcGis 10.1 (Esri, 2010)..... | 37 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 2 5. Inmunoimpresión de nervaduras de caña de azúcar. Muestras con reacción positiva a SCYLV presentan coloración violeta en sus haces vasculares. Izquierda: lote de 30 muestras de hoja de caña de azúcar impresas por duplicado. Derecha: fotos tomadas a la observación de la lupa estereoscópica. Arriba: muestra con reacción positiva a SCYLV, la flecha indica una reacción serológica de color púrpura en las células del floema. Abajo: muestra con reacción negativa a SCYLV..... | 40 |
| Figura 2 6. Incidencia y prevalencia de SCYLV en las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy. | 41 |
| Figura 2 7. Incidencia y prevalencia de SCYLV en las nueve variedades muestreadas en las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy..... | 42 |
| Figura 2 8. Incidencia e incidencia ponderada de SCYLV en las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy. | 44 |
| Figura 2 9. Foto tomada a campo durante los muestreos donde se observan tres muestras colectadas con síntomas de amarillamiento de la nervadura central en el envés de hojas de caña de azúcar (superiores) y tres muestras sin expresión de síntomas (inferiores). | 45 |
| Figura 2 10. Mapa de interpolación de la incidencia de SCYLV en los departamentos muestreados de Tucumán, mediante el método IDW (potencia = 2) programa ArcGis 10.1 (Esri, 2010)..... | 47 |
| Figura 2 11. Mapa geoestadístico interpolativo tridimensional de la dispersión del amarillamiento de la caña de azúcar en el ingenio Ledesma (Jujuy) en función de la incidencia de SCYLV. Programa Surfer 10. | 48 |
| Figura 2 12. Mapa geoestadístico interpolativo tridimensional de la dispersión del amarillamiento de la caña de azúcar en el ingenio San Martín del Tabacal (Salta) en función de la incidencia de SCYLV. Programa Surfer 10. | 48 |
| Figura 3 1. Árbol filogenético radial sin raíces a partir de 14 secuencias nucleotídicas de especies virales pertenecientes a la familia Luteoviridae alineadas con Clustal X y construido mediante análisis de máxima verosimilitud con DNAML de Phylip v. 3.57c y TreeView. Los géneros Polerovirus, Luteovirus y Enamovirus están individualmente encerrados en círculos. La escala utilizada se encuentra en la figura. Tomado de Moonan <i>et al.</i> (2000). | 55 |
| Figura 3 2. Organización genómica de <i>Potato leafroll virus</i> (PLRV). Tomado de King <i>et al.</i> , 2012. | 56 |

Figura 3 3. Mapas elaborados con la aplicación ArcMap perteneciente el software ArcGis versión 10.0. A. Ubicación de los departamentos muestreados en las provincias de Salta, Tucumán y Jujuy. B. Ubicación y detalle de los distintos genotipos detectados en el departamento Orán, provincia de Salta. C. Ubicación y detalle de los distintos genotipos detectados en el departamento Ledesma, provincia de Jujuy. D. Ubicación y detalle de los distintos genotipos detectados en 7 departamentos muestreados en la provincia de Tucumán. 64

Figura 3 4. Geles agarosa 2% donde se exponen a modo de resumen 9 muestras de las 50 analizadas, con el objetivo de mostrar la amplificación de bandas a las 3 alturas deseadas. (-) negativo de la mix. S testigo negativo a SCYLV. MPM marcador de peso molecular de 100 a 1000 pb, banda fuerte a 500 pb. Calles 1 a 9, nueve muestras que resumen la detección de los tres genotipos dentro de las 50 muestras analizadas. 362 pb, altura de banda que detecta el genotipo BRA-PER. 450 pb, altura de banda que detecta el genotipo CUB. 905 pb, altura de banda que detecta el genotipo REU. 66

Figura 3 5. Porcentaje de incidencia de las distintas combinaciones de genotipos de SCYLV detectados en 50 muestras positivas al virus. A. genotipo BRA-PER. B. genotipos REU y BRA-PER. C. genotipos CUB y BRA-PER. D. genotipos CUB, REU y BRA-PER. 67

Figura 4 1. Características de la materia prima para ser de alta calidad y a un bajo costo. (Fuente: Romero *et al.*, 2009). 73

Figura 4 2. Comparación de la composición química entre tallos maduros e inmaduros al momento de la molienda (Fuente: Romero *et al.*, 2009). 76

Figura 4 3. Fotos de síntomas característicos de las principales enfermedades fúngicas, bacterianas y virales del cultivo de caña de azúcar en Argentina. (Fotos A, B, C, E, F, G y H tomadas de Romero *et al.*, 2009; foto D tomada de cincae.org). 78

Figura 4 4. Detalle del proceso de toma de muestras a campo. A. lote comercial de la variedad LCP 85-384 ubicado en EEA INTA-Famailá. B. etiqueta en la planta donde se tomó la muestra número 1. C. 200 muestras empaquetadas y refrigeradas para su traslado a Córdoba. D. impresión de la nervadura central de una hoja de caña de azúcar en membrana de nitrocelulosa. 81

Figura 4 5. Detalle del proceso de cosecha. A. corte, despunte y deshojado de las cañas marcadas a campo. B. atados de 5 cañas separadas en dos grupos según presencia/ausencia SCYLV. C. jugo de caña en dos preparaciones diferentes para su posterior análisis. D.

polarímetro con muestras de jugo de caña por detrás. E. refractómetro, con una muestra de jugo de caña. 83

Figura 4 6. Presencia de SCYLV en lotes comerciales de LCP 85-384. Izquierda: EEA INTA-Famaillá. Derecha: Ingenio Ledesma. Muestras positivas a SCYLV en color rojo. 85

Figura 4 7. Comparación de las mediciones de °Brix (izquierda) y lectura polarimétrica (derecha) en relación a la procedencia de las muestras (Famaillá y Ledesma) y su sanidad (SCYLV negativas y SCYLV positivas). 88

Figura 4 8. Resultados obtenidos para pol jugo, pol caña, pureza y rendimiento sacarino en relación a la procedencia de las muestras (Famaillá y Ledesma) y su sanidad (SCYLV negativas y SCYLV positivas). 90

RESUMEN

El cultivo de caña de azúcar en Argentina promueve el desarrollo territorial y el agregado de valor en origen. El uso de la caña semilla como medio de multiplicación, puede traer aparejado la propagación de enfermedades sistémicas, como las causadas por virus. La enfermedad del amarillamiento foliar causada por *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) está ampliamente estudiada a nivel mundial. En Argentina, desde la detección de SCYLV en el año 2002 hasta la fecha, no hay estudios epidemiológicos contundentes que contribuyan al conocimiento del comportamiento de la enfermedad ni tampoco sobre el impacto productivo y económico de la misma en cañaverales del noroeste argentino. Es por ello que esta tesis tiene como objetivo determinar la distribución e intensidad de SCYLV, identificar los genotipos virales presentes y estimar la disminución en el rendimiento sacarino con su consecuente impacto económico en cañaverales del NOA. En los años 2015 y 2016 para evaluar la incidencia y prevalencia de SCYLV se muestrearon 141 lotes comerciales de caña de azúcar totalizando 4.184 muestras de hoja (+1) colectadas al azar, provenientes de las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy. Las muestras fueron analizadas mediante TBIA y los resultados obtenidos arrojaron valores de incidencia entre 12 al 45% y de prevalencia del 46 al 83%. Se seleccionaron al azar muestras positivas para determinar los genotipos virales presentes mediante RT-PCR. Detectando al genotipo BRA-PER en la totalidad de las muestras y a los genotipos CUB y REU en el 8 y 36%, respectivamente; siendo los resultados de esta tesis, la primera detección de CUB y REU en el país. Para estimar el efecto en el rendimiento a causa de la presencia de SCYLV, se llevaron a cabo tres ensayos en EEA-INTA Famaillá y en los ingenios San Martín del Tabacal y Ledesma. Las plantas del ensayo fueron probadas mediante TBIA y se cosecharon por separado positivas y negativas al virus. Los resultados mostraron disminuciones en el rendimiento sacarino al comparar el estado sanitario de las muestras. Se concluye que el amarillamiento es una enfermedad que afecta al cultivo de caña de azúcar en el NOA, siendo necesaria la incorporación de la detección y diagnóstico del virus como práctica de rutina en los planes de mejoramiento tendientes a la creación de nuevas variedades comerciales.

ABSTRACT

Sugarcane crop in Argentina promotes the territorial development and the value-added products. The use of seed cane as multiplication method brings the propagation of systemic diseases, like those caused by viruses. Yellow leaf disease is worldwide studied. In Argentina, since the detection of *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) in 2002 to date, there are not conclusive epidemiological studies that contribute to the knowledge neither of the disease's behavior nor on the productive and economic disease impact in cane fields of the northwest Argentinian. The aims of this work were to determine the distribution and intensity of SCYLV, identify the viral genotypes presents and estimate sucrose yield decrease and the consequent economic impact. In 2015 and 2016, 141 commercial plots of sugarcane were sampled totaling 4184 random leaf samples (+1) from Tucumán, Salta and Jujuy. The samples were analyzed by TBIA and the results obtained showed incidences of 12 to 45% and prevalences of 46 to 83%. 50 positive samples were randomly selected to determine the viral genotypes present by RT-PCR. BRA-PER genotype was detected in all the samples and CUB and REU genotypes in 8 and 36%, respectively. Being the results of this thesis, the first detection of CUB and REU in the country. To estimate the effect on yield due to the presence of SCYLV, three yield assays were carried out (in EEA-INTA Famailá and in San Martin del Tabacal and Ledesma sugar mills). Plants were tested by TBIA and positive and negative samples were separately harvested. The results showed decreases in sucrose yield when healthy and sick samples were compared. We concluded that yellow leaf disease affects sugarcane crops in NOA, being necessary the incorporation of SCYLV detection and diagnosis as a routine practice in the breeding plans tending to create new commercial varieties.

Lista de símbolos y abreviaturas

| | |
|---------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| %: porciento | CONAE: Comisión Nacional de Actividades Espaciales de Argentina |
| -: negativo | CP: cápside proteica |
| +: positivo | CTAB: Bromuro de cetiltrimetilamonio |
| +1: primera hoja de caña de azúcar con cuello visible | d.C.: después de Cristo |
| +2: segunda hoja de caña de azúcar con cuello visible | DEPC: Dietil policarbonato |
| +3: tercer hoja de caña de azúcar con cuello visible | dNTP: Desoxirribonucleótido trifosfato |
| μl: microlitro | EEA: Estación Experimental Agropecuaria |
| μM: micromolar | EEAOC: Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres |
| a.C.: antes de Cristo | ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas |
| ADN: ácido desoxirribonucleico | GPS: sistema de posicionamiento global |
| AMV: <i>Avian Myeloblastosis Virus</i> | gr: gramos |
| ARN: ácido ribonucleico | ha: hectárea |
| ATF: Factor de transmisión de áfidos | ICTV: Comité internacional de taxonomía de virus |
| BCIP: 5-bromo, 4-cloro, 3-indolil fosfato | INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria |
| BYDV: <i>Barley yellow dwarf virus</i> | IPAVE: Instituto de Patología Vegetal |
| CAA: Centro azucarero argentino | KDa: Kilo Dalton |
| CaMV: <i>Cauliflower mosaic virus</i> | M: molar |
| CENICAÑA: Centro de investigación de la caña de azúcar de Colombia | |

MgCl₂6H₂O: cloruro de magnesio hexahidratado

MgSO₄: sulfato de magnesio

min: minuto

ml: mililitro

mM: milimolar

MP: proteína de movimiento

n: tamaño muestral

NaCl: cloruro de sodio

NBT: cloruro de nitroblue tetrazolium

nm: nanómetro

NOA: Noroeste argentino

° C: grados centígrados

ORF: marcos abiertos de lectura

pb: pares de bases

PEMV: *Pea enation mosaic virus*

PLRV: *Potato leafroll virus*

qRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa en tiempo real

RdRp: región RNA dependiente de la RNA polimerasa

rpm: revoluciones por minuto

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa

SCMV: *Sugarcane mosaic virus*

SCYLaV: Sugarcane yellow leaf disease- associated virus

SCYLD: Sugarcane yellow leaf disease

SCYLV: *Sugarcane yellow leaf virus*

ScYP: Sugarcane yellows phytoplasma

Seg: segundos

SrMV: *Sorghum mosaic virus*

t: tonelada

TAE: Tampón Tris-acetato-EDTA

TBIA: *Tissue Blot immunoassay*

TBS: solución salina tamponada

Tfl: *Thermus flavus*

TuMV: *Turnip mosaic virus*

UTR: regiones no codificantes

UV: ultravioleta

vol: volumen

VPg: proteína viral ligada al genoma

YLS: yellow leaf síndrome

Antecedentes

La caña de azúcar (*Saccharum* spp.) perteneciente a la familia de las poáceas, es una especie perenne con ciclo fotosintético de tipo C4, de crecimiento erecto y macolladora. Originaria de Nueva Guinea, luego a cargo de antiguos navegantes es llevada a India para luego comenzar a cultivarse en China alrededor del año 4.500 a.C., en el año 642 a.C. los persas invaden India y adoptan la caña de azúcar, posteriormente en el siglo VII d.C. los árabes conquistan Persia y la caña es llevada al norte de África, donde es refinada por primera vez. En la edad media llega a Europa y con la conquista de América es traída al continente donde posteriormente se expande a todas las regiones cálidas (Verheye, 2010). En Argentina fue introducida por los jesuitas y con la instalación de los primeros ingenios, se convirtió en el motor de la primera agroindustria a mediados del siglo XVIII en las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy (Malizia *et al.*, 2014).

Las variedades comerciales son híbridos de *S. robustum*, *S. officinarum* y *S. spontaneum*, siendo *S. barberi* y *S. sinense* también incluidos en algunos cruzamientos. El cultivo se desarrolla desde regiones tropicales a subtropicales entre la latitud 36.5°N y 31.0°S del Ecuador, variando su capacidad productiva entre 40 a 150 t de caña/ha y de 3.5 a 15 t de azúcar /ha. Las fases fenológicas del cultivo comienzan con la emergencia y establecimiento de la población inicial de tallos; luego se continúa con el crecimiento vegetativo de las cañas y su posterior macollamiento, en esta fase se establece el número potencial de órganos cosechables (tallos) y culmina con el cierre del cañaveral; posteriormente comienza el periodo de gran crecimiento, donde se determina el rendimiento cultural definiéndose la producción de caña (cantidad de tallos molibles, peso fresco por tallo e inicio del almacenamiento de azúcar en los entrenudos); finalmente, la última fase fenológica comprende la maduración del cultivo donde se define el contenido final de sacarosa en los tallos y producción de azúcar por unidad de área (Fig. 1.1) (Digonzelli *et al.*, 2015). Los requerimientos ambientales para el crecimiento del cultivo son suelos de alta fertilidad (grandes cantidades de nitrógeno y potasio); temperaturas que no descendan de los 10-12°C y que no

superen los 45-50°C, intensidades crecientes de radiación solar y alta disponibilidad de agua (Digonzelli *et al.*, 2015). El clima ideal para su cultivo es aquel que presenta una estación caliente y húmeda (lo cual favorece la germinación, macollaje y desarrollo vegetativo) y otra fría y seca (para las fases de madurez y acumulación de sacarosa en los tallos) (Malizia *et al.*, 2014).

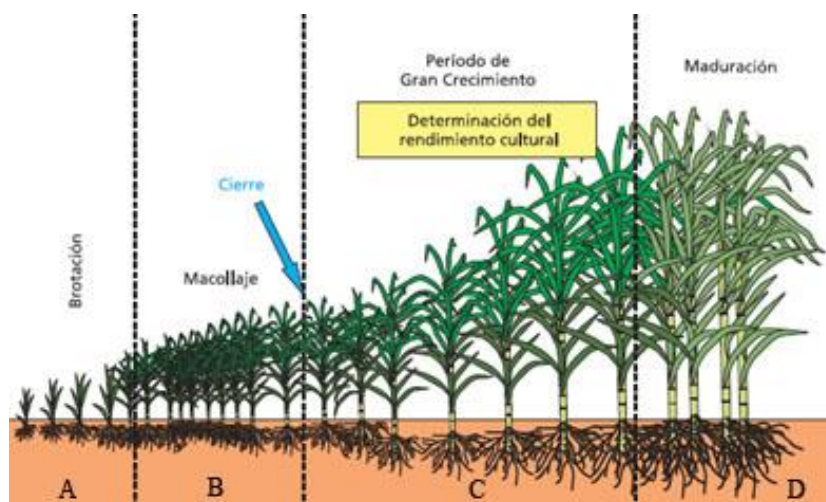


Figura 1 1. Fases fenológicas del cultivo de caña de azúcar. **A.** Emergencia y establecimiento de la población inicial de tallos (brotación). **B.** Crecimiento vegetativo de las cañas y macollaje. **C.** Período de gran crecimiento, donde se determina el rendimiento cultural. **D.** Maduración del cultivo y definición de la producción de azúcar. Tomado de Romero *et al.*, 2009.

En Argentina el cultivo ocupa 376.223 hectáreas (Benedetti y Morales, 2018), distribuidas entre las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy (aproximadamente el 97% del total) y Santa Fe y Misiones el resto (Romero *et al.*, 2009); siendo la época de implantación entre los meses de mayo a noviembre, con un ciclo aproximado de un año y medio cuando se realiza la plantación en los meses de febrero/marzo y se cosecha en julio del año siguiente, o bien un ciclo anual cuando se siembra en julio y se cosecha en julio del siguiente año. La cosecha (zafra) se realiza entre los meses de junio a octubre, según el ciclo del cultivo (Malizia *et al.*, 2014). En Argentina la utilización de la caña de azúcar tiene diferentes propósitos, siendo los más importantes la producción de azúcar de mesa, alcohol para bebida, fibra y carbohidratos para alimentación animal, bioetanol, papel, energía eléctrica, entre otros (Ríos y Delgado Cordero, 2008) (Fig. 1.2). De todo el etanol que se produce en el país, el 50,76% corresponde a etanol en base a maíz y el 49,24% a etanol en base a caña de azúcar, estas cantidades representan un crecimiento del 33,13% en la producción total de etanol en el año 2017 en comparación al año anterior, donde el

72,11% del incremento corresponde a etanol a base de caña de azúcar (Di Sciullo *et al.*, 2017). Con respecto a la producción de azúcar; Tucumán, Salta y Jujuy concentran el 99,5% de la producción en Argentina (Anino y Pizzo, 2016). En el año 2017 se exportaron 9.614,95 toneladas métricas de azúcar blanco y 1.250 toneladas métricas de azúcar crudo, siendo Chile y Bélgica, los principales países importadores, respectivamente (Di Sciullo *et al.*, 2017). Finalmente, en Argentina el 15% de la industria de celulosa y papel tiene como materia prima el bagazo de la caña de azúcar (Cerutti, 2016); esto es de suma importancia ya que implica una producción de papel a partir de fibras celulósicas alternativas, protegiendo al medio ambiente.

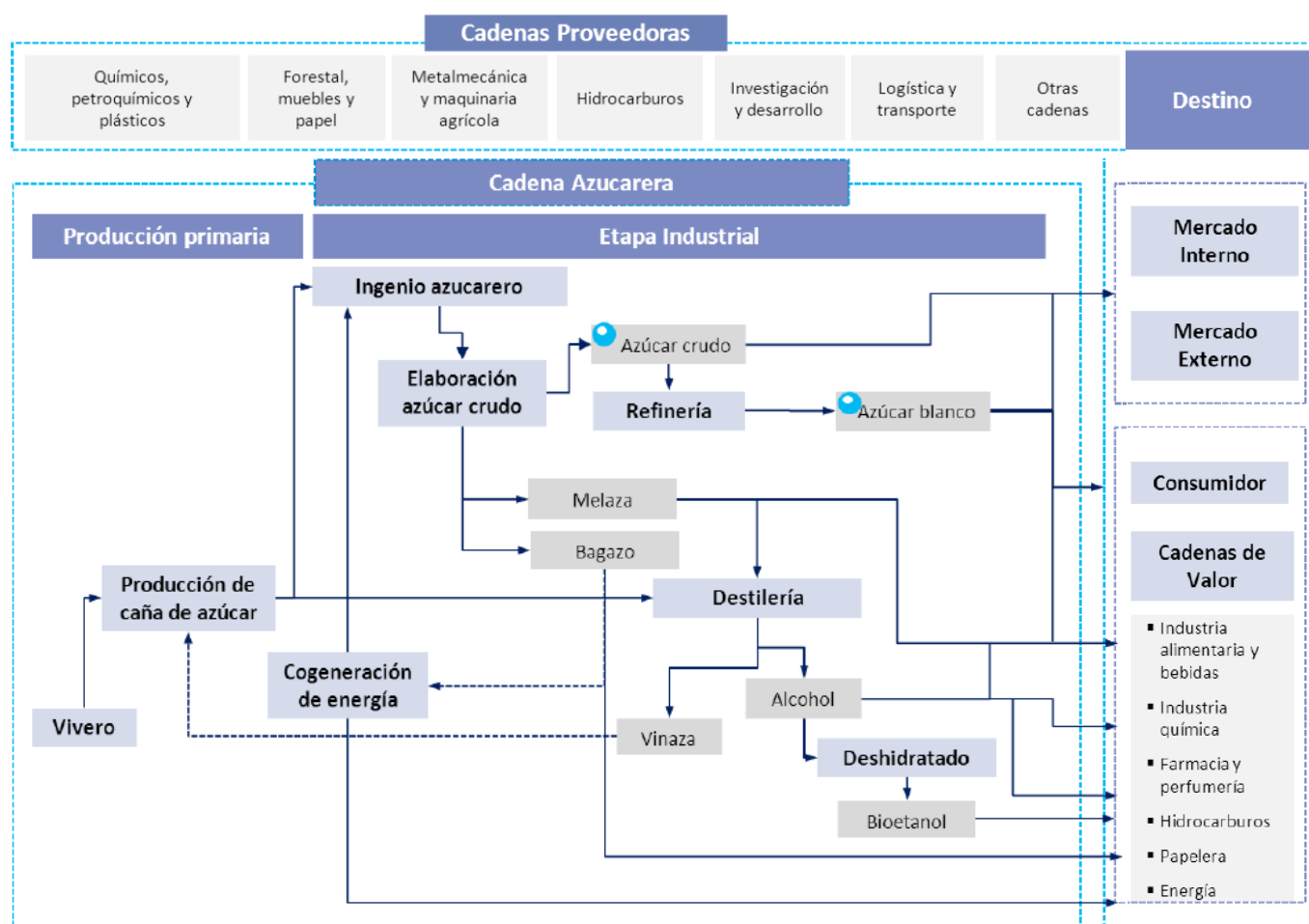


Figura 1 2. Cadena azucarera en Argentina (producción primaria, etapa industrial y destino). Se muestran los procesos productivos en color celeste, los productos en color gris y la reutilización de subproductos en línea azul punteada. Tomado de Anino y Pizzo, 2016.

Debido a la importancia del cultivo de caña de azúcar en nuestro país, se vuelve fundamental considerar los aspectos que mejoren el nivel de producción; como las características del suelo, empleo de caña semilla de calidad, fertilización y riego, manejo de plagas, malezas y enfermedades, entre otros. El manejo eficiente de las enfermedades dentro del cultivo debe ser precedido por la detección y diagnóstico del patógeno causal, para posteriormente estudiar al mismo como una población de patógenos dentro de una población de hospedantes y la enfermedad resultante de dicha interacción, en un tiempo determinado y bajo la influencia del ambiente y el manejo que el hombre realiza sobre el cultivo. De esta forma, al hablar de poblaciones, surge el concepto epidemiológico de tetraedro de la enfermedad (Fig. 1.3), donde se estudian las interrelaciones entre una población de patógenos virulentos con una población de hospedantes susceptibles, en un ambiente favorable para la manifestación de la enfermedad (en el cual se incluye el manejo del hombre), durante un periodo de tiempo suficiente como para que la enfermedad cause daño (Castaño Zapata, 2002).

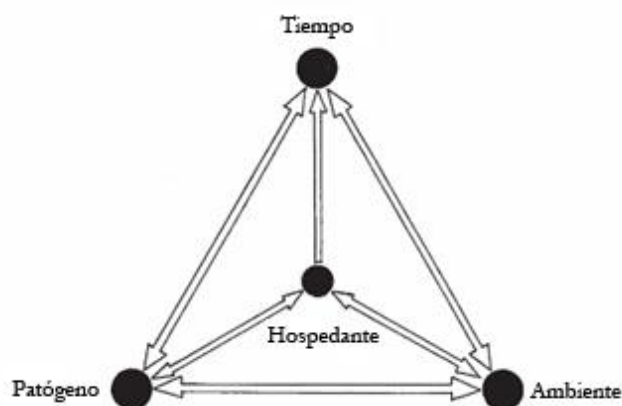


Figura 1 3. Tetraedro de la enfermedad. Interrelaciones entre una población de patógenos y una población de hospedantes bajo la influencia del ambiente y el tiempo. Adaptado de Castaño Zapata, 2002.

Dentro de las principales enfermedades que afectan al cultivo en las zonas de producción de Argentina, encontramos enfermedades fúngicas, tales como carbón (*Ustilago scitaminea*), roya marrón (*Puccinia melanocephala*) y roya naranja (*Puccinia kuehnii*), esta última reportada solo en Misiones; entre las bacterianas podemos nombrar como de importancia económica al raquitismo de la soca (*Leifsonia xyli subsp. xyli*) y la escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans*). Entre las enfermedades virales más importantes se encuentra el mosaico de la caña

de azúcar, cuyos agentes causales son *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), *Sorghum mosaic virus* (SrMV) (ambos del género Potyvirus); y el amarillamiento foliar o yellow leaf syndrome (YLS), cuyos agentes causales son *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) (género Polerovirus) y Sugarcane yellows phytoplasma (ScYP) (Shenck *et al.*, 1997; Cronjé *et al.*, 1998); siendo a la fecha, SCYLV el único agente causal detectado en Argentina (Moonan y Mirkov, 2002). La propagación agámica de la caña de azúcar a partir de caña semilla, trae aparejada la distribución de enfermedades sistémicas. En este cultivo, esta forma de propagación se convierte en la principal vía de transmisión de SCYLV (Rassaby *et al.*, 2004).

Dentro de las enfermedades virales presentes en el cultivo de caña de azúcar, la enfermedad del amarillamiento foliar está ampliamente estudiada a nivel mundial, desde su primera detección en Hawái en la variedad H65-7052 en el año 1989 (Schenck, 1997a), hasta la fecha, donde año a año se detecta la ocurrencia de la enfermedad en los países productores de caña, estando ampliamente distribuido en numerosos países de América, Asia, África (Komor *et al.*, 2010)) donde el virus se distribuye entre países a partir de material propagativo infectado.

El síntoma característico del amarillamiento foliar es el cambio de color de la nervadura central que se torna de color amarillo intenso, cuando la lámina aún está verde (Fig. 1.4). En algunas ocasiones la hoja se necrosa comenzando desde la punta hacia la base. La sintomatología depende del cultivar y de las condiciones ambientales, pudiéndose también incluir el acortamiento de los entrenudos terminales y acumulación de sacarosa en las nervaduras (Rott *et al.*, 2000). Estos síntomas no son estrictamente debidos a la presencia de los agentes causales de la enfermedad (SCYLV y ScYP) y pueden asociarse a condiciones climáticas tales como estrés abiótico, daño por insectos, carencias nutricionales, entre otros, de esta forma, plantas negativas a SCYLV pueden presentar síntomas como así también pueden encontrarse plantas positivas a SCYLV asintomáticas (Schenck y Lehrer, 2000).

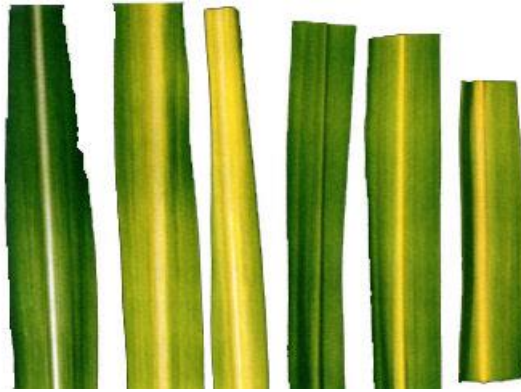


Figura 1 4. Hojas de caña de azúcar con síntomas característicos de la enfermedad del amarillamiento foliar. La primera y cuarta hoja desde la izquierda, no presentan síntoma. Adaptado de Rott *et al.*, 2000.

SCYLV es un virus de ARN de sentido positivo y cadena simple, restringido a floema, icosaédrico de 25-30 nm de diámetro, con aproximadamente 5800 nucleótidos, 6 marcos abiertos de lectura (ORF0 a ORF5) y 3 regiones no codificantes (UTR) (Smith *et al.*, 2000).

La principal forma de transmisión es a partir de la multiplicación vegetativa de la caña de azúcar, denominada caña-semilla. Pero también se transmite de manera persistente circulativa a partir de áfidos vectores tales como *Ceratovacuna lanigera*, *Rhopalosiphum maidis* y *Melanaphis sacchari* (Fig. 1.5). Estos áfidos adquieren el virus luego de periodos prolongados de alimentación con plantas que presentan SCYLV alojado en el floema; donde una vez infectados, el virus circula por el organismo pero no se multiplica dentro de él. La eficiencia de transmisión disminuye con el tiempo a medida que la concentración del virus va disminuyendo también (Scagliusi y Lockhart, 2000).

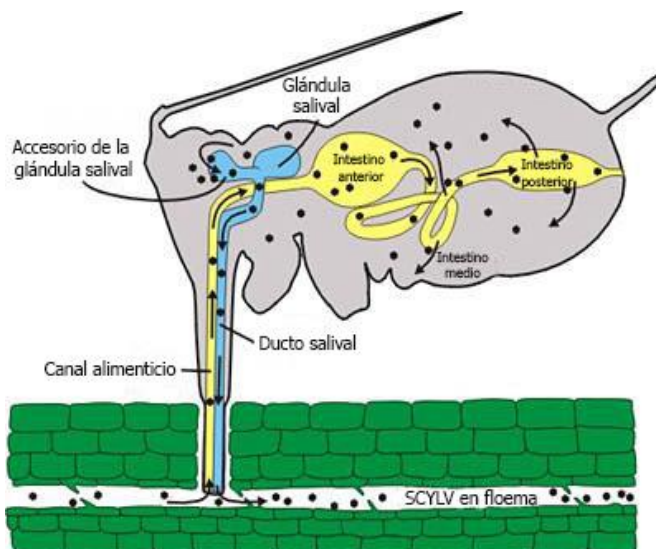


Figura 1 5. Transmisión persistente circulativa de un áfido vector alimentándose de una planta hospedante. Detalle de la circulación interna del virus SCYLV en el floema y en el aparato digestivo del áfido. (Adaptada de <http://www.apsnet.org/edcenter/illglossary>)

La detección de SCYLV se realiza comúnmente mediante las técnicas de *Tissue Blot immunoassay* (TBIA) (Schenck *et al.*, 1997b); reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR), con y sin detección fluorescente en tiempo real (Xie *et al.*, 2009; Comstock *et al.*, 1994) y en menor medida mediante la amplificación isotérmica basada en la secuencia del ácido nucleico, a partir del método de baliza molecular (NASBA-MBP) (Gonçalves *et al.*, 2002).

La diversidad intraespecífica del SCYLV ha llevado a que se detecte una gran cantidad de razas virales, denominadas genotipos. Moonan y Mirkov (2002) analizaron la diversidad genotípica del SCYLV en muestras provenientes de las regiones Norte, Centro y Sur de América, y descubrieron que un grupo de aislamientos provenientes de Colombia formaban parte del origen filogenético de todas las muestras y lo denominaron COL. En el año 2006 Abu Ahmad *et al.* (2006a), mediante RT-PCR detectaron al menos 3 genotipos virales diferentes, que según el país de origen posteriormente se los denomina: BRA por su origen en Brasil, PER por su origen en Perú y CUB por su origen en Cuba, encontrando un cuarto genotipo al cual denomina REU, por su origen en Isla Reunión (Abu Ahmad *et al.*, 2006b). Año tras año, nuevos genotipos son detectados en todo el mundo, contando hasta la fecha con 5 más, denominados: IND, por su origen en India (Viswanathan *et al.*, 2008); CHN1, CHN2 y CHN3, originarios de China (Wang y Zhou, 2010; Wang *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2014) y el genotipo HAW, originario de Hawái (ElSayed *et al.*, 2011). Estudios realizados por Abu Ahmad *et al.* (2007) sugieren que SCYLV varía en virulencia y capacidad de infección según el genotipo viral que sea, de esta forma el genotipo BRA-PER es uno de los más virulentos y la combinación de BRA-PER con REU es más agresiva aún.

A causa de la presencia de SCYLV en los tallos, se han evidenciado disminuciones en el contenido sacarino en las industrias y probablemente la explicación a esto resida en el comportamiento del virus dentro de la planta, el cual al alojarse en los haces floemáticos, bloquea la translocación de carbohidratos desde la hoja al tallo, por lo que llegado el momento de la cosecha, el rendimiento sacarino en el ingenio disminuye (Zhu *et al.*, 2010). Este proceso tiene como

resultado disminuciones significativas del rendimiento debido a un aumento de la concentración de sacarosa dentro de las hojas y una reducción dentro de los tallos (Rassaby *et al.*, 2003). Diversos estudios han cuantificado la disminución de rendimiento, entre ellos, Rassaby *et al.* (2003) evidenciaron pérdidas en el rendimiento sacarino de hasta 20% en variedades susceptibles, aún en plantas asintomáticas; siendo las mayores pérdidas encontradas en Brasil en la variedad SP71-6163 con un 25% de disminución en el rendimiento sacarino (Vega *et al.*, 1997).

En Argentina, se observa la enfermedad por sintomatología en el año 1997 (Ramallo y Ploper, 1998) y recién en el año 2002 se detecta la aparición del virus en una muestra de hoja mediante técnicas moleculares (Moonan y Mirkov, 2002), momento a partir del cual se inician los estudios sobre la virosis en el país, siempre con enfoque en el NOA (región productora de azúcar), debido al efecto que produce el virus en la translocación de azúcares. Rago (2010) detecta por primera vez el virus mediante técnicas serológicas y posteriormente Bertani *et al.* (2014) realizan los primeros estudios de incidencia y distribución de SCYLV en 149 muestras provenientes del NOA. A la fecha no hay estudios realizados sobre el efecto que causa el virus en la producción de azúcar en los ingenios y solo se ha detectado un genotipo viral (BRA-PER) de los diez citados mundialmente. Cafrune *et al.* (2012) identifican el genotipo BRA-PER mediante RT-PCR en plantas sintomáticas y asintomáticas en lotes comerciales y en la colección de germoplasma de INTA-Famailá y Bertani *et al.* (2014) detectan únicamente el genotipo BRA-PER en 29 muestras positivas a SCYLV colectadas en Tucumán y Salta.

Hipótesis

Sugarcane yellow leaf virus está ampliamente distribuido en cañaverales del noroeste argentino afectando el rendimiento sacarino a nivel industrial, encontrándose diversidad de genotipos virales.

Objetivo general

Determinar la distribución, genotipos virales y efecto en el rendimiento de la enfermedad del amarillamiento en caña de azúcar producido por *Sugarcane yellow leaf virus* en las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy.

Objetivos específicos

- Establecer la distribución e intensidad del amarillamiento en el cultivo de caña de azúcar en las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy.
- Identificar los genotipos virales de SCYLV presentes en las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy y la distribución de los mismos en el área analizada.
- Establecer el efecto del amarillamiento sobre el rendimiento sacarino y su impacto económico.

Antecedentes

El cultivo de caña de azúcar se desarrolla en regiones tropicales a subtropicales entre la latitud 36.5°N y 31.0°S del Ecuador. Según la Organización Internacional de Azúcar, los diez principales países productores en el año 2016 fueron: Brasil, India, Tailandia, China, México, Pakistán, Australia, Estados Unidos, Guatemala e Indonesia (*International Sugar Organization*). Según datos tomados del centro azucarero argentino (CAA), Argentina produce 2,5 millones de toneladas de azúcar distribuidas entre las provincias de Tucumán, Salta, Jujuy, Santa Fe y Misiones; donde las provincias del NOA poseen el 97% de la superficie cultivada con caña de azúcar y representan el 99,5% del total de la producción de azúcar del país (Fig. 2.1) (Anino y Pizzo, 2016).



Figura 2 1. Superficie destinada a la producción de caña de azúcar y producción de azúcar en Argentina (Fuente: Anino y Pizzo, 2016)

El Laboratorio de Sistemas de Información Territorial (SIT- INTA Famaillá) determinó que la superficie con caña de azúcar a cosechar durante la zafra 2018 es de 376.223 ha en todo el país, obteniendo dicho resultado al procesar las imágenes satelitales provistas por la CONAE. Tucumán cuenta con aproximadamente 273.737 ha, (Fig. 2.2); Siendo los principales departamentos productores de caña de azúcar: Leales (con el 19,87% de las ha plantadas), seguido de Cruz Alta (con el 17,48%), Simoca (14,53%), Burruyacu (11,57%) y con menos del 10% de la superficie cañera los departamentos: Monteros, Chicligasta, Rio Chico, Famaillá,

La Cocha, Lules, Alberdi, Graneros, Tafí Viejo, Yerba Buena y S.M. Tucumán (Benedetti y Morales, 2018).

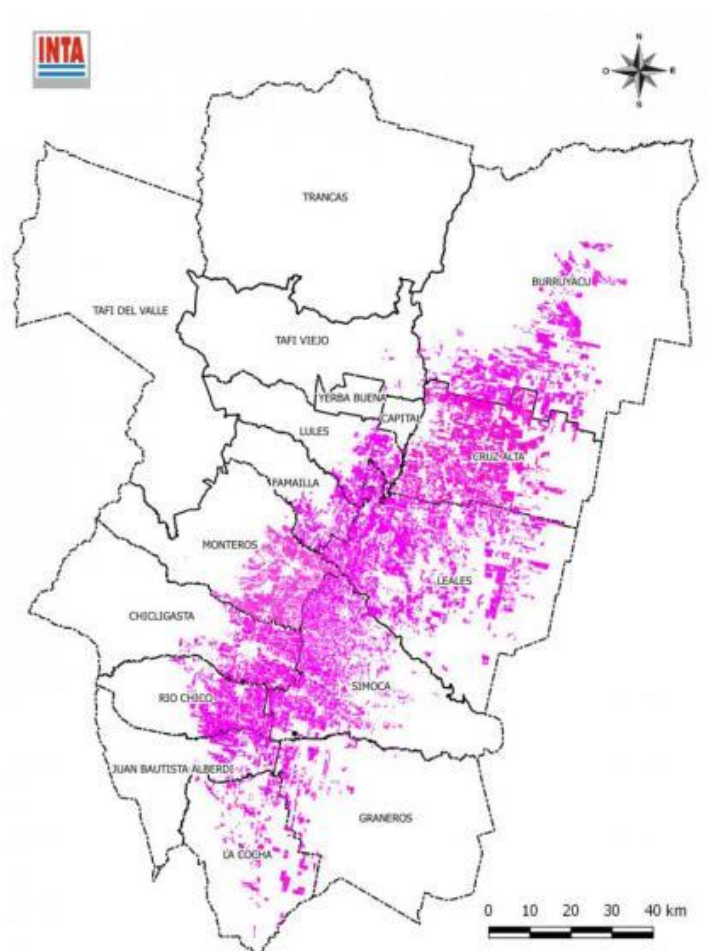


Figura 2 2. Superficie plantada con caña de azúcar en Tucumán (2018). (Fuente: Benedetti y Morales, 2018)

Por otro lado, en el sector cañero de las provincias de Salta y Jujuy la realidad es diferente, donde los ingenios son propietarios aproximadamente del 90% de la caña que procesan. En Salta, 34.934 ha abastecen a 2 ingenios (San Isidro y San Martín del Tabacal) y 63.158 ha cultivadas en Jujuy provisionan a 3 ingenios (La Esperanza, Ledesma y Río Grande) (Centro Azucarero Argentino).

Las variedades comerciales de caña de azúcar son una herramienta tecnológica empleada para incrementar los niveles de producción y rentabilidad de los establecimientos cañeros. Las características que destacan a una variedad son, entre otras, la elevada producción de caña/ha, buena acumulación de sacarosa en época de cosecha, alto nivel sacarino en jugo, resistencia a enfermedades y niveles de

producción aceptables en cortes sucesivos (Digonzelli *et al.*, 2015). La distribución varietal en Tucumán durante la campaña 2016-2017 tuvo una gran participación de la variedad LCP 85-384 (76,78%) seguida de TUC 95-10 con un 10,3%, TUC 77-42 (9,71%), TUC 97-8 (1,21%) y un 2% con otras variedades comerciales, (Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres). Por otro lado, la distribución varietal en el Ingenio Ledesma para la zafra 2018 (quien cultiva aproximadamente el 60% de la superficie cañera de la provincia) está constituida por las variedades CP 70-1133, TUC 77-42, NA 96-2929, NA 90-1001, LCP 85-384, NA 97-3152, NA 97-563, NA 05-860, NA 03-3300, entre otras (Ing. Agr. Cecilia Easdale, Ingenio Ledesma, comunicación personal). En Salta, el 80% de la superficie cañera pertenece al Ingenio San Martín del Tabacal, encontrando entre las variedades de mayor superficie implantada a LCP 85-384, NA 90-1001, NA 96-2929, NA 97-3152, NA 03-3300, NA 05-860, entre otras (Ing. Agr. Gonzalo Ibarra, Ingenio San Martín del Tabacal, comunicación personal).

Numerosas plagas y enfermedades afectan al cultivo de caña de azúcar en Argentina y el mundo, siendo *Sugarcane yellow leaf virus* el agente causal de la enfermedad del amarillamiento, patología mundialmente distribuida donde año a año se detecta en diferentes zonas de producción desde su primera detección en Hawái en el año 1989 (Shenck 1997a) y en Brasil en la década del 90' (Vega *et al.* 1997). A la fecha, el síndrome del amarillamiento en caña de azúcar ha sido detectado en numerosos países productores (Fig. 2.3) (Komor *et al.*, 2010).



Figura 2 3. Detección de SCYLV en distintas zonas de producción de caña de azúcar. Los recuadros rojos y rosas indican la presencia de SCYLV y los recuadros blancos la ausencia del mismo. Los números dentro de los recuadros indican el año de cuando se hizo la prueba en búsqueda de la presencia/ausencia de SCYLV. (Adaptado de Komor *et al.* 2010)

Luego de identificar a SCYLV como uno de los agentes etiológicos de la enfermedad (Vega *et al.*, 1997) y desarrollar un suero específico para detectarlo, permitiendo realizar muestreos de forma masiva y confiable (Shenck *et al.*, 1997b); diversos estudios fueron llevados a cabo para determinar la incidencia y prevalencia del virus en las zonas productoras de caña de azúcar del mundo. De esta forma, uno de los primeros estudios fue realizado en Colombia, donde SCYLV se detecta por primera vez mediante la semipurificación del luteovirus en variedades de la colección de germoplasma de CENICAÑA; a partir de este primer registro del virus, el mismo se ha seguido encontrando en lotes comerciales de diferentes variedades, donde un año más tarde, ya había sido detectado en muestras provenientes de 3.785 ha pertenecientes a once ingenios azucareros del valle geográfico del río Cauca, con una amplia distribución en la región siendo su mayor incidencia en la parte sur del valle con un 17,7% (Victoria Kafure *et al.*, 1998; Victoria *et al.*, 1999). En Isla Mauricio, en junio y septiembre de 1997 se realizaron dos muestreos para estudiar la incidencia de SCYLV en 66 variedades provenientes de la colección de germoplasma de caña de azúcar; además, en 75 campos de la variedad comercial M1658/78 se colectaron las hojas +2 y +3 pertenecientes a 6 tallos seleccionados al azar en cada campo muestreado. Tanto las muestras provenientes de la colección de germoplasma como las provenientes de lotes

comerciales, fueron evaluadas mediante ELISA para determinar la presencia/ausencia de SCYLV. Los resultados obtenidos evidenciaron una incidencia del virus en la colección de germoplasma de 27% en junio y 71% en septiembre del mismo año. Por otro lado, el virus fue detectado en el 27% de los lotes comerciales de la variedad M1658/78, con una amplia prevalencia en el centro, norte y sur de la isla (Moutia y Saumtally, 1999). Estudios complementarios llevados a cabo en 88 campos de Isla Mauricio y 20 variedades diferentes, refuerzan los resultados antes obtenidos concluyendo que SCYLV está ampliamente distribuido en todos los campos y variedades muestreadas, a excepción de la variedad M1176/77, la cual resultó negativa a la prueba de TBIA y RT-PCR (Khooodoo *et al.* 2010). En el año 1999, se determina la incidencia de SCYLV en clones de Canal Point (CP) provenientes del programa de desarrollo de variedades de Florida; los muestreos se realizaron en 6 zonas incluyendo 13 cultivares diferentes y la detección se realizó mediante TBIA con antisuero específico contra SCYLV, encontrando siempre una alta incidencia del virus que año a año se fue incrementando. Los resultados demostraron que SCYLV está ampliamente distribuido siendo común entre los cultivares CP de Florida e indicando una alta susceptibilidad de los mismos a SCYLV (Comstock *et al.*, 1999). En complemento a este estudio, Comstock *et al.* (2001) analizan los clones pertenecientes a cada especie de *Saccharum* spp. presentes en la colección mundial de germoplasma de los Estados Unidos ubicada en Miami (Florida) con el objetivo de detectar la presencia de SCYLV, determinar su incidencia y encontrar posibles fuentes de resistencia entre las distintas especies. Los resultados obtenidos reflejaron una alta incidencia en los clones de *S. officinarum* (75,8%), seguido de *S. robustum*, *S. sinense* y *S. barberi* (con una incidencia de 62,5, 46,2 y 13,6% respectivamente), donde los clones de la especie *S. spontaneum* fueron los que evidenciaron una menor incidencia de SCYLV con un 7%. Los autores concluyen de esta forma, que *S. officinarum* se comporta como susceptible a la enfermedad mientras que *S. spontaneum* se comportó como resistente a la misma; similares resultados son obtenidos por el mismo autor en el año 2005 (Comstock *et al.*, 2005). El primer reporte de la presencia generalizada de SCYLV en zonas de producción de India y Sri Lanka se realizó en el año 2001 detectando el virus en 32 de 95 variedades comerciales testeadas (Rao *et al.*, 2001). Posteriormente, mediante RT-PCR, SCYLV se detecta en nueve estados de la India, indicando una amplia

distribución del virus en el país (Singh *et al.*, 2011). En Venezuela, la primera detección de SCYLV se realiza en el año 2001 en el estado de Yaracuy, en muestras sintomáticas y asintomáticas de once variedades de caña de azúcar (Izaguirre-Mayoral *et al.*, 2002). Posteriormente se determinó la incidencia de SCYLV en variedades de caña de azúcar pertenecientes al banco de germoplasma de Venezuela (provenientes de los estados de Yaracuy, Lara y Portuguesa), y en plantaciones comerciales y experimentales. Mediante la técnica de detección TBIA, 77 variedades de 82 muestreadas presentaron SCYLV (92,42%), estos resultados evidenciaron la presencia generalizada del virus en la región centroccidental de Venezuela (Lopez *et al.*, 2004). Pese a que síntomas de amarillamiento han sido observados desde 1980 en Isla Reunión, la primera detección del virus se realiza en 1996; estudios posteriores realizados sobre 2.100 muestras pertenecientes a tres variedades comerciales provenientes de 6 sitios diferentes dan como resultado una incidencia que varía del 10 al 100% concluyendo que la misma depende de la variedad y la procedencia (Rassaby *et al.*, 1999). En el año 2006 investigaciones acerca de la distribución de SCYLV fueron llevadas a cabo en el sur de China. El patógeno se identificó mediante RT-PCR y los resultados obtenidos mostraron una incidencia de la enfermedad comprendida entre 0,5-10%, llegando eventualmente en algunos campos al 80%. Los autores concluyen que SCYLV es un virus exótico que invade el sur de China en los últimos años; ocurriendo, a la fecha, una dispersión con baja incidencia en los cañaverales (Zhou *et al.*, 2006). Muestras de hoja de más de 300 variedades de caña de azúcar provenientes de la colección de germoplasma y de plantaciones situadas en el área cañera de mayor importancia de Tailandia fueron analizadas mediante TBIA, durante los años 2000, 2001, 2002 y 2003. SCYLV fue detectado en todas las regiones, encontrando una incidencia del 27% entre las variedades muestreadas. De las variedades provenientes de Fiji, solo el 17% estaban infectadas por el virus, mientras que entre el 84 a 100% de las variedades provenientes de Canal Point (Florida, Estados Unidos) y Kantalai (Sri Lanka) estaban infectadas (Lehrer *et al.*, 2008). Estudios sobre la distribución de SCYLV en diferentes provincias de Cuba y sus variantes genéticas fueron llevados a cabo durante los meses de enero y febrero del 2011; la prospección abarcó 13 provincias cubanas donde se muestrearon al azar 35 campos de caña de azúcar. En cada campo muestreado, se seleccionaron 5 puntos (Noroeste, Noreste, Medio, Suroeste, Sureste), dentro de cada punto de muestreo se seleccionaron al azar tres

tallos tomando la hoja +1 de cada uno, totalizando 525 muestras. La detección de SCYLV se realizó mediante TBIA y los resultados obtenidos determinaron por primera vez en Cuba la presencia de SCYLV en todas las provincias donde se cultiva caña de azúcar (Aday Díaz *et al.*, 2014a). Dichos resultados motivaron al autor a llevar a cabo estudios sobre la incidencia del virus en la colección de germoplasma de Cuba, donde evalúa 1.603 individuos de la colección de germoplasma de la provincia de Matanzas (Cuba), provenientes de 25 países y regiones del mundo. Detectando mediante TBIA una incidencia del virus del 39,2% (Aday Díaz *et al.*, 2014b). Uno de los últimos trabajos publicados sobre la epidemiología de SCYLV en las distintas zonas de producción de caña de azúcar del mundo, es el realizado por Amata *et al.* (2016), quienes colectan 183 muestras de hoja durante los meses de abril y mayo de 2012 provenientes de lotes comerciales de caña de azúcar en Kenia, detectando a SCYLV en el 47% de las muestras mediante técnicas moleculares.

En la zona de producción de caña de azúcar más importante de Argentina, en el año 1997 se observó un amarillamiento generalizado en cañaverales de Tucumán, siendo esta sintomatología similar a la descrita para YLS, pese a esto, los autores concluyen que no cuentan con elementos suficientes para asegurar que los síntomas observados son debido a la presencia de YLS (Ramallo y Ploper, 1998). Posteriormente Moonan y Mirkov (2002), detectan por primera vez a SCYLV, mediante RT-PCR en una muestra proveniente de Salta y reportan la secuencia genómica de la cápside proteica. Recientemente, Bertani *et al.* (2014) analizan la distribución de SCYLV en la provincia de Tucumán durante dos años consecutivos de muestreo (2011 y 2012) en los cuales colecta al azar 149 muestras pertenecientes a variedades comerciales y clones del programa de mejoramiento de la EEAOC. Las muestras fueron probadas mediante RT-PCR y los resultados obtenidos reflejaron una incidencia del 19,46% (29(+)/149 muestras). Las muestras positivas estuvieron uniformemente distribuidas en 5 de las 6 zonas muestreadas; dichas zonas son donde se mantienen las plantas del plan de mejoramiento de la EEAOC (representando todas las regiones agroecológicas diferentes donde se desarrolla el cultivo de caña de azúcar en la provincia de Tucumán). Por otro lado, el 66% de las muestras positivas pertenecieron a variedades comerciales, siendo RA 87-3 la variedad más afectada por el virus (Bertani *et al.*, 2014).

Los antecedentes epidemiológicos antes expuestos, evidenciaron la necesidad de estudiar las formas de transmisión de SCYV en el cultivo de caña de azúcar. La mayoría de los virus son perpetuados en la naturaleza a través de la transmisión de planta en planta. Para que esta ocurra es necesario que acontezca alguno de los medios de transmisión tales como la propagación vegetativa de los cultivos, heridas naturales o provocadas por el hombre (transmisión mecánica), unión de tejidos por medio de injertos, semillas, polen o bien por la acción de vectores tales como insectos, ácaros, nematodos, protozoarios y hongos (Rezende *et al.*, 2011). Estudios sobre la dispersión de SCYLV en campos de caña de azúcar de Isla Reunión, mostraron que la tasa de infección en las variedades R570, R575 y R579 permanecía estable durante 24 a 30 meses, esto indica que los tallos infectados no revierten su condición sanitaria de un ciclo de cultivo para otro. Esta estabilidad relativa en la tasa de infección también sugiere que los insectos vectores tienen un rol menor durante la dispersión espaciotemporal del patógeno, especialmente en las variedades R570 y R579. Los autores concluyen que debido a la baja tasa de infección en estas dos variedades y al no incremento durante el periodo de observación, SCYLV probablemente se disemine en Isla Reunión en esas dos variedades, a partir de la plantación de caña semilla infectada (Rassaby *et al.*, 2004). En Isla Mauricio se detecta al áfido vector *Melanaphis sacchari* en tan solo el 8% de los campos muestreados, por lo que los autores concluyen que la principal causa de dispersión del virus es por caña semilla infectada (Khoodoo *et al.*, 2010). Estudios realizados en el sur de China, asocian la distribución de SCYLV con el áfido *Ceratovacuna lanigera* (Zhou *et al.*, 2006). Otros estudios sobre transmisión del virus mediante áfidos, arriban a la conclusión de que bajo condiciones del cultivo en Hawái, SCYLV se transmite exclusivamente por *Melanaphis sacchari*, ya que otros áfidos comunes en la región, no fueron compatibles con el cultivo y/o no transmitían el virus (Lehrer *et al.*, 2007). En adición, Chinnaraja y Viswanathan (2015) detectan que *Melanaphis sacchari* es un eficiente vector de SCYLV. Se concluye por lo tanto que la principal forma de transmisión de SCYLV es a partir de la multiplicación vegetativa de la caña de azúcar, denominada caña-semilla; aunque también se transmite de manera circulativa - no propagativa a partir de áfidos vectores (Scagliusi y Lockhart, 2000).

Otro factor importante a tener en cuenta para un mejor entendimiento de la enfermedad a campo, es la expresión de síntomas. La mayoría de las plantas

infectadas por virus exterioriza la enfermedad por medio de síntomas, los cuales pueden clasificarse en locales y sistémicos; siendo éstos últimos los que se encuentran con mayor frecuencia (Rezende *et al.*, 2011). El síntoma de amarillamiento generalizado, se caracteriza por ser causado por virus que infectan el floema, reduciendo el flujo de fotosintatos y acumulando almidón en las hojas, con la consecuente degeneración del sistema radicular y alteración en la absorción de nutrientes (Rezende *et al.*, 2011). En un principio, la enfermedad del amarillamiento foliar en caña de azúcar era diagnosticada ante la presencia de síntomas. Luego de detectarse como agentes causales de la enfermedad al virus *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) y al fitoplasma *Sugarcane yellows phytoplasma* (ScYP), los estudios sobre dispersión de la enfermedad comienzan a realizarse mediante la detección de dichos patógenos. Esto produjo que surgieran hipótesis contrapuestas entre los investigadores en relación al amarillamiento foliar, su agente causal y la expresión de síntomas. Algunos autores sostienen que no hay asociación entre presencia del virus y síntomas de amarillamiento: En el año 1999, estudios sobre la detección y dispersión de SCYLV en Isla Mauricio concluyen que basarse solamente en la sintomatología no es confiable, debido a que el virus fue detectado en plantas asintomáticas; esto trae aparejado que la infección y consecuente dispersión de SCYLV no sea detectada a campo, resultando en una desestimación del problema fitopatológico (Moutia y Saumtally, 1999). En Colombia, el diagnóstico de la enfermedad mediante la observación visual de síntomas resultó difícil, debido a que algunas variedades no mostraban síntomas externos y eran positivas a SCYLV y a su vez, plantas con síntomas similares a los de la enfermedad resultaron negativas al virus (Victoria *et al.*, 1999). Al estudiar la distribución de SCYLV en Cuba mediante TBIA no se encontró asociación estadística entre la presencia de síntomas de amarillamiento y la presencia de SCYLV (Chi-cuadrado $P=0,7204$ y Fisher exacta $P=0,4864$) (Aday Diaz *et al.*, 2014a). En Hawái se observó que existía relación entre la presencia de SCYLV y los síntomas de amarillamiento, esto es debido a que solo las variedades susceptibles y medianamente susceptibles mostraron síntomas severos; las plantas libres de virus y variedades resistentes rara vez mostraron síntomas, y las que presentaban síntomas eran en un grado leve; un gran porcentaje de muestras positivas a SCYLV mostraron síntomas y finalmente, las variedades susceptibles que presentaron infección de SCYLV, tuvieron una severidad de síntomas cuatro

veces mayor que aquellas plantas de la misma variedad y negativas al virus. De todas formas no hubo una correlación estricta entre la presencia del virus y el desarrollo de síntomas, debido a que algunas variedades con alta infección de SCYLV solo presentaron síntomas leves, o por el contrario, variedades con síntomas intensos de la enfermedad, solo presentaron un grado intermedio de infección. Por lo tanto, los autores concluyen que otros aspectos son necesarios de considerar, tales como la confiabilidad del método de detección empleado, la confiabilidad en la determinación de los síntomas y considerar que otros factores pueden haber intervenido en la expresión o supresión de los síntomas (Lehrer y Komor, 2008). En contraparte, otros autores sugieren que la presencia de síntomas y ausencia del virus se debe a la presencia de otro agente causal, como sucedió en los muestreos realizados por Bertani *et al.* (2014) en Tucumán, donde 4 muestras sintomáticas resultaron negativas a SCYLV mediante RT-PCR y al analizarlas en el microscopio óptico, detectaron que presentaban gran cantidad de cristales en células parenquimáticas que contenían clorofila. Si bien los autores no determinaron la composición de los cristales, sugieren que es probable que sean de oxalatos y que estén asociados a la infección por fitoplasmas. Finalmente, existe la teoría de que la sensibilidad de la técnica comúnmente empleada en los muestreos (TBIA) no es suficiente para detectar el virus en bajas concentraciones, dando como resultado falsos negativos en plantas sintomáticas. Esta hipótesis es respaldada por Zhu *et al.* (2010), quienes observan reacciones positivas en RT-PCR y qRT-PCR a muestras que se pensaban que eran negativas (basadas en resultados de TBIA) provenientes de variedades inmunes a la infección del virus.

Objetivo

Establecer la distribución e intensidad del amarillamiento en el cultivo de caña de azúcar en las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy.

Materiales y Métodos

- Recolección de muestras

En las principales provincias productoras de caña de azúcar de Argentina (Tucumán, Salta y Jujuy) se realizaron muestreos aleatorios (año 2015 y 2016) colectando 30 hojas +1 (primera hoja con cuello visible) por lote seleccionado, donde en cada lote se registró su posición mediante las coordenadas geográficas obtenidas con GPS (Fig. 2.4). La recolección de muestras se realizó en forma aleatoria, identificando aquellas muestras que presentaban síntomas de amarillamiento en la nervadura central, y con la premisa de muestrear las variedades que ocupaban mayor superficie en dichas provincias, como así también, abarcar la mayor extensión posible dentro del área de producción provincial. De esta forma, se recolectó un total de 4.184 muestras provenientes de 141 lotes correspondientes a las variedades LCP 85-384, TUC 77-42, RA 87-3, NA 90-1001, NA 96-2929, NA 97-3152, NA 03-3300, NA 05-860, CP 70-1133 (Tab. 2.1). Las muestras colectadas fueron refrigeradas hasta su traslado al laboratorio de virología (IPAVE-INTA) donde fueron procesadas y almacenadas a -40°C hasta su análisis.

Tabla 2 1. Número de lotes (N° lotes), muestras (N° muestras) y muestras sintomáticas (con síntoma) colectadas al azar en las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy durante los años 2015 y 2016. De cada provincia se detallan las variedades muestreadas.

| Provincia | Variedad | N° Lotes | N° muestras | Con Síntoma |
|--------------|--------------|------------|-------------|-------------|
| Tucumán | LCP 85-384 | 64 | 1898 | 15 |
| | TUC 77-42 | 19 | 553 | 2 |
| | RA 87-3 | 4 | 120 | 0 |
| | <i>total</i> | 87 | 2571 | 17 |
| Salta | LCP 85-384 | 4 | 119 | 0 |
| | NA 90-1001 | 3 | 90 | 0 |
| | NA 96-2929 | 2 | 60 | 0 |
| | NA 97-3152 | 6 | 179 | 0 |
| | NA 03-3300 | 3 | 90 | 0 |
| | NA 05-860 | 1 | 30 | 0 |
| | <i>total</i> | 19 | 568 | 0 |
| Jujuy | LCP 85-384 | 7 | 207 | 1 |
| | NA 90-1001 | 7 | 210 | 0 |
| | NA 96-2929 | 7 | 209 | 1 |
| | CP 70-1133 | 7 | 209 | 0 |
| | TUC 77-42 | 7 | 210 | 0 |
| | <i>total</i> | 35 | 1045 | 2 |
| Total | | 141 | 4184 | 19 |

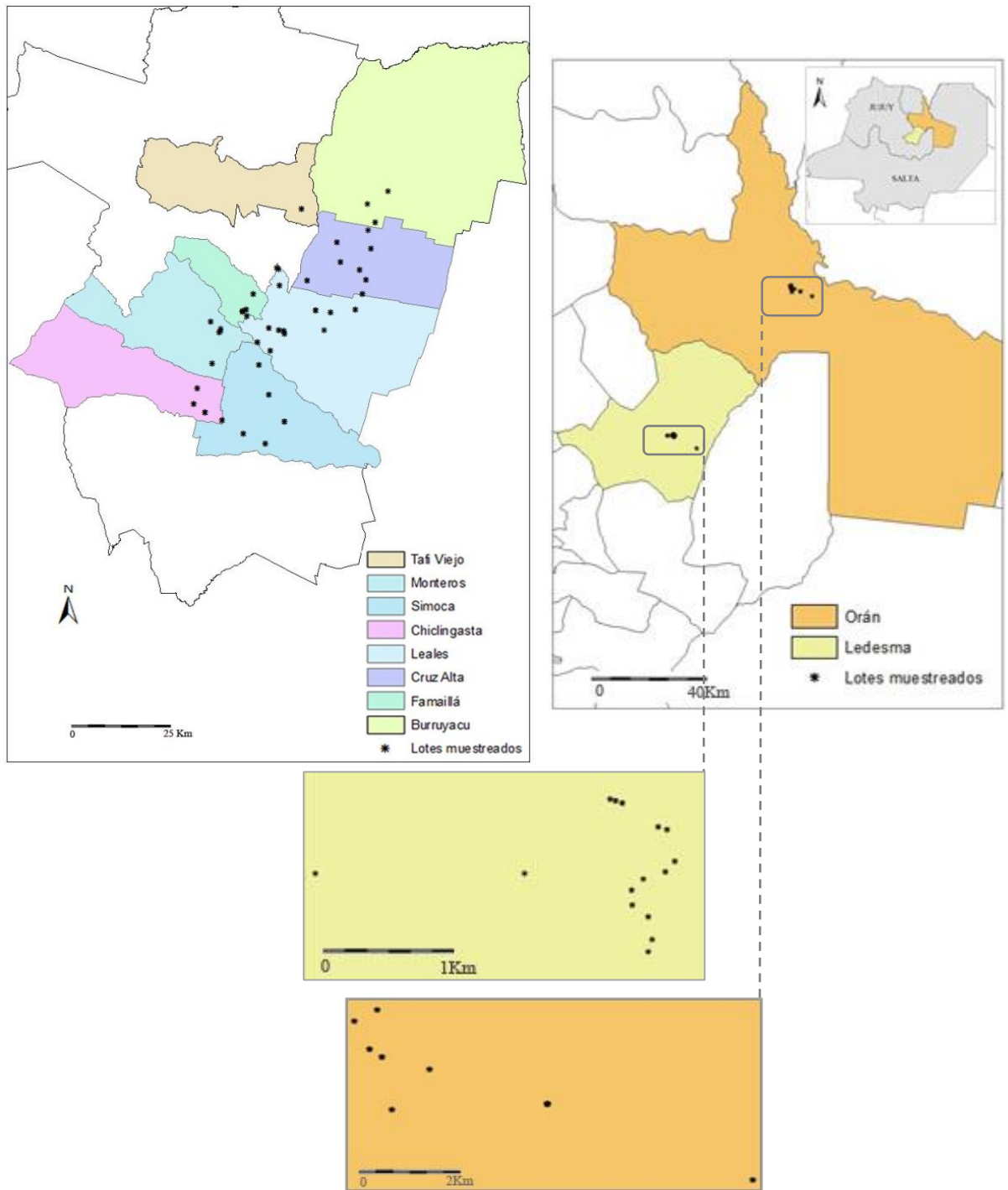


Figura 2 4. Departamentos y lotes muestreados en las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy durante los años 2015 y 2016. Mapas elaborados con el programa ArcGis 10.1 (Esri, 2010).

- Detección de SCYLV mediante *tissue blot immunoassay*

Mediante la técnica serológica *tissue blot immunoassay* (TBIA), descrita por Schenck *et al.* (1997b), con anticuerpo específico para SCYLV obtenido de proteína recombinante, se analizó el total de las muestras colectadas durante los muestreos. La técnica se realizó en membranas de nitrocelulosa de 6cm x 4cm donde se efectuó la impresión de la nervadura central de cada muestra por duplicado, totalizando 60 impresiones por membrana y por lote; de esta manera el antígeno viral quedó adsorbido directamente a la membrana de nitrocelulosa. Posteriormente con un agente bloqueante (TBS+5% leche en polvo+2% de tritón x-100) se cubrieron los sitios de unión no saturados de las membranas durante toda una noche, al día siguiente las membranas se enjuagaron 3 veces con tampón lavado (TBS+0.05% Tween 20) en agitación durante 5 min cada lavado. Luego se incubaron con inmunoglobulina (Ig) específica contra SCYLV (gentileza de Dr. Lockhart, universidad de Minnesota) diluida 1/2.000 en tampón antisuero (TBS+2% leche en polvo) durante 2 horas en agitación, seguido de 3 enjuagues con tampón lavado de 5 min cada uno y en agitación. Posteriormente las membranas se incubaron durante 1 hora en agitación con inmunoglobulina anti-Ig (obtenida en cabra) conjugada con enzima fosfatasa alcalina (BIO-RAD) y diluida en tampón antisuero (1/3.000). Seguido de 3 lavados de 5 min cada uno con tampón lavado. Para visualizar la reacción, las membranas se incubaron, durante 30-45 min en ausencia de luz, en tampón sustrato pH 9 (0.1M trisma base+ 0.1M NaCl+ 5mM MgCl₂6H₂O) junto a BCIP (5-bromo, 4-cloro, 3-indolil fosfato) y NBT (cloruro de nitroblue tetrazolium); por cada 5 ml de tampón sustrato se agregó 33µl NBT y 16.5µl BCIP. La reacción se detuvo con la inmersión de las membranas en agua destilada, se secaron en papel tisú y se almacenaron a temperatura ambiente. Posteriormente se observaron bajo lupa estereoscópica y se consideraron positivas, aquellas muestras que presentaron al menos un haz vascular con coloración violeta.

- Análisis estadísticos

Se determinó la distribución del SCYLV mediante el cálculo de incidencia y prevalencia a partir de las muestras colectadas durante el muestreo. Considerando incidencia al número de muestras positivas en el total de muestras colectadas; dicho

cálculo se realizó a distintas escalas: variedades y provincias. La prevalencia se calculó a partir del número de lotes con al menos una muestra positiva, en el total de lotes muestreados y al igual que con la incidencia, se realizaron análisis a escala de variedad y de provincia. Mediante el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2017) se realizaron gráficos de barras con desvío estándar para visualizar los valores obtenidos de incidencia y prevalencia.

Con el dato de las hectáreas que ocupa cada variedad muestreada en cada provincia, se realizó una ponderación de la incidencia en función del porcentaje que ocupa la superficie de cada variedad en relación al total de las hectáreas con caña de azúcar cultivadas en cada provincia.

Para evaluar si existió asociación entre la presencia de síntomas de amarillamiento en hoja y la presencia de SCYLV, se generó una tabla de clasificación cruzada a partir de datos categorizados mediante tablas de contingencia en el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2017).

- Elaboración de mapas

En la provincia de Tucumán, a partir de la interpolación de los puntos tomados por el GPS y mediante el método IDW del Software ArcGis 1.0 (Esri, 2010), se obtuvo un mapa de estimación de la incidencia de SCYLV en áreas no muestreadas, bajo el supuesto de que la variable incidencia representada cartográficamente disminuye su influencia a mayor distancia desde su ubicación de muestra. La potencia utilizada para la elaboración de dicho mapa fue de 2 (valor predeterminado).

En los ingenios Ledesma (Jujuy) y San Martín del Tabacal (Salta), se realizaron mapas tridimensionales mediante el método geoestadístico interpolativo (Kriging) del programa Surfer Vers. 10 ®. El fundamento de este método es similar a IDW, pudiendo extrapolar valores no incluidos en el rango de datos del eje Z (porcentaje de incidencia).

Resultados

Los 141 lotes muestreados, de donde se colectaron 4.184 muestras, se distribuyen entre las provincias de Tucumán (87), Salta (19) y Jujuy (35). Los departamentos muestreados en Tucumán fueron: Tafí Viejo, Monteros, Simoca, Chicligasta, Leales, Cruz Alta, Famaillá y Burruyacu; en la provincia de Salta se muestrearon campos del Ingenio San Martín del Tabacal (departamento Orán) y en la provincia de Jujuy se muestrearon campos pertenecientes al Ingenio Ledesma (departamento Ledesma) (Fig 2.4). Como resultado de la técnica serológica TBIA se obtuvieron 141 membranas de nitrocelulosa (correspondientes a cada lote muestreado) con la impresión de 30 muestras por duplicado pertenecientes a cada lote (Fig. 2.5).

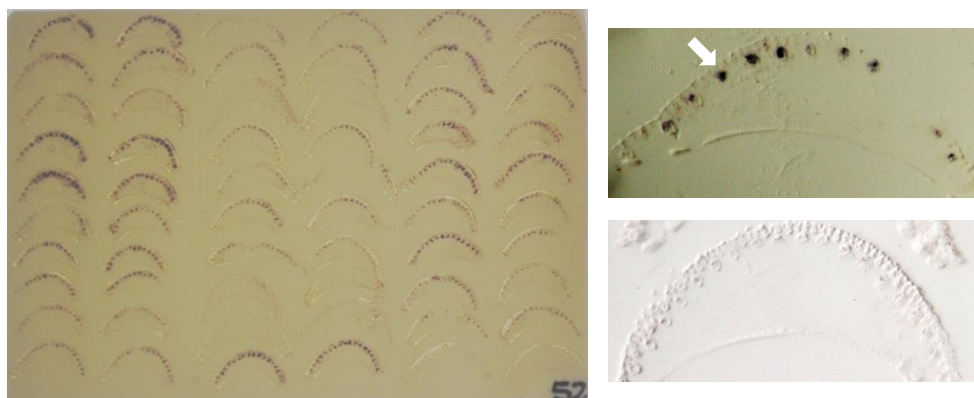


Figura 2 5. Inmunoimpresión de nervaduras de caña de azúcar. Muestras con reacción positiva a SCYLV presentan coloración violeta en sus haces vasculares. Izquierda: lote de 30 muestras de hoja de caña de azúcar impresas por duplicado. Derecha: fotos tomadas a la observación de la lupa estereoscópica. Arriba: muestra con reacción positiva a SCYLV, la flecha indica una reacción serológica de color púrpura en las células del floema. Abajo: muestra con reacción negativa a SCYLV.

De la observación de las membranas bajo lupa estereoscópica se detectaron 897 muestras positivas a SCYLV de 4.184 muestras colectadas. En Tucumán de 2571 muestras colectadas, se detectó que 351 muestras reaccionaron al virus mediante TBIA, mientras que en la provincia de Salta 70/568 fueron positivas y en Jujuy 476/1.045 (Tab. 2.2). Por otro lado, 83 lotes de 141 tuvieron al menos una muestra positiva a SCYLV, distribuidos en Tucumán (40/87), Salta (14/19) y Jujuy (29/35) (Tab. 2.2). De los resultados antes expuestos se obtuvo una incidencia del virus de 12% en Salta, 14% en Tucumán y 45% en Jujuy mientras que la

prevalencia fue de 46, 74 y 83% para las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy, respectivamente (Fig. 2.6).

Tabla 2 2. Detalle de la cantidad de muestras colectadas y lotes muestreados por provincia (columna: total), cantidad de muestras y lotes positivos a SCYLV detallado por provincia (columna: +SCYLV) y cantidad de muestras y lotes negativos a SCYLV por provincia (columna: -SCYLV). El total de muestras y lotes negativos y positivos al virus como el total de muestras colectadas y lotes muestreados se detalla en la última fila en negrita.

| Provincia | Muestras | | | Lotes | | |
|--------------|--------------|------------|--------------|-----------|-----------|------------|
| | -SCYLV | +SCYLV | total | -SCYLV | +SCYLV | total |
| Tucumán | 2.220 | 351 | 2.571 | 47 | 40 | 87 |
| Salta | 498 | 70 | 568 | 5 | 14 | 19 |
| Jujuy | 569 | 476 | 1045 | 6 | 29 | 35 |
| Total | 3.287 | 897 | 4.184 | 58 | 83 | 141 |

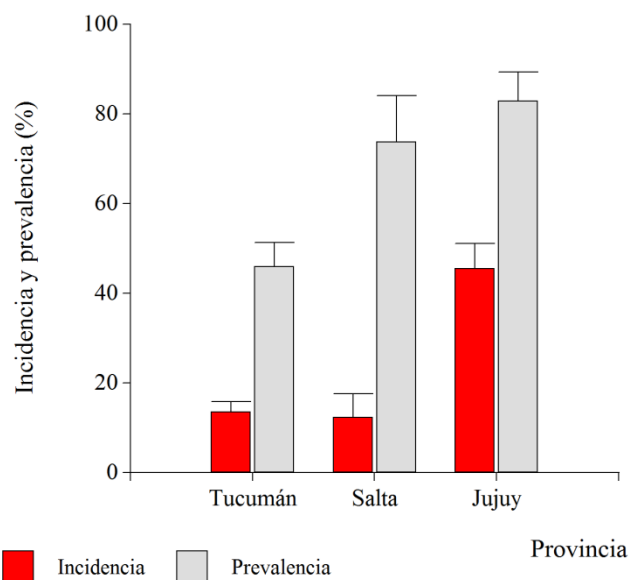


Figura 2 6. Incidencia y prevalencia de SCYLV en las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy.

En cuanto a las variedades, la tabla 2.3 resume la cantidad de muestras y lotes positivos detectados en cada una de las variedades muestreadas. La incidencia de SCYLV entre las variedades muestreadas resultó menor al 10% para las variedades NA 03-3000, TUC 77-42, NA 97-3152; entre 10 y 30% para las variedades RA 87-3, LCP 85-384 y CP 70-1133 y finalmente una incidencia en el rango de 50 a 90% para las variedades NA 96-2929, NA 90-1001 y NA 05-860 (Fig. 2.7). En cuanto a la prevalencia del virus en los lotes muestreados, las

variedades LCP 85-384, NA 97-3152, CP 70-1133, NA 90-1001, NA 96-2929 y NA 05-860 presentaron una prevalencia superior al 50%, donde las últimas tres variedades mencionadas, llegaron a un 100%. Mientras que las variedades RA 87-3, NA 03-3300 y TUC 77-42 presentaron prevalencias menores al 50% siendo TUC 77-42 la variedad de menor prevalencia con un 12% (Fig. 2.7).

Tabla 2 3. Detalle de la cantidad de muestras colectadas y lotes muestreados por variedad (columna: total), cantidad de muestras y lotes positivos a SCYLV detallado por variedad (columna: +SCYLV) y cantidad de muestras y lotes negativos a SCYLV por variedad (columna: -SCYLV). El total de muestras y lotes negativos y positivos al virus como el total de muestras colectadas y lotes muestreados se detalla en la última fila en negrita.

| Variedad | Muestras | | | Lotes | | |
|--------------|--------------|------------|--------------|-----------|-----------|------------|
| | -SCYLV | +SCYLV | total | -SCYLV | +SCYLV | total |
| LCP 85384 | 1.787 | 437 | 2.224 | 28 | 47 | 75 |
| CP 701133 | 143 | 66 | 209 | 1 | 6 | 7 |
| NA 033300 | 88 | 2 | 90 | 2 | 1 | 3 |
| NA 05860 | 4 | 26 | 30 | 0 | 1 | 1 |
| NA 901001 | 120 | 180 | 300 | 0 | 10 | 10 |
| NA 962929 | 143 | 126 | 269 | 0 | 9 | 9 |
| NA 973152 | 165 | 14 | 179 | 1 | 5 | 6 |
| RA 873 | 105 | 15 | 120 | 3 | 1 | 4 |
| TUC 7742 | 732 | 31 | 763 | 23 | 3 | 26 |
| Total | 3.287 | 897 | 4.184 | 58 | 83 | 141 |

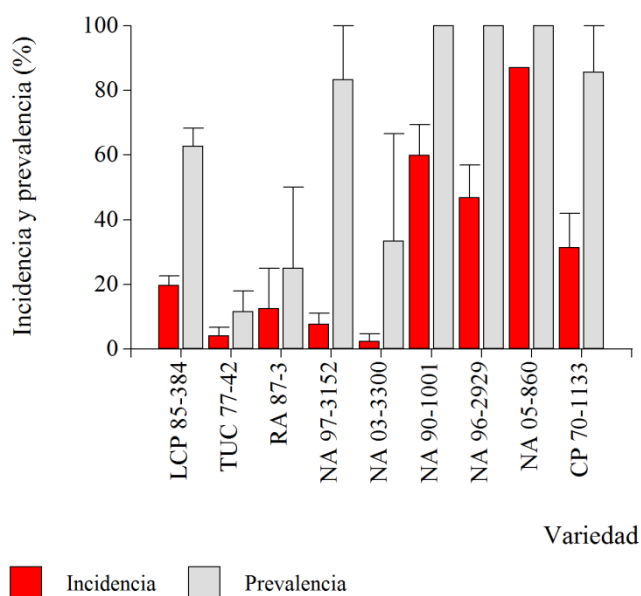


Figura 2 7. Incidencia y prevalencia de SCYLV en las nueve variedades muestreadas en las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy.

Los resultados obtenidos al ponderar los porcentajes de incidencia del virus al porcentaje de superficie por provincia que ocupa cada variedad muestreada se exponen en la tabla 2.4. La incidencia ponderada en las provincias de Salta y Jujuy decreció en comparación al cálculo inicial de incidencia. Salta tuvo una incidencia del 12% que al ser ponderada por la superficie ocupada por las variedades LCP 85-384, NA 90-1001, NA 96-2929, NA 97-3152, NA 03-3300 y NA 05-860 en relación a las 28.000 ha cultivadas con caña de azúcar en dicha provincia, evidenció una incidencia ponderada del 5,16% (Fig. 2.8). Por otro lado, Jujuy tuvo una incidencia del 46% pero al ser ponderada por la superficie ocupada con las variedades LCP 85-384, NA 90-1001, NA 96-2929, CP 70-1133 y TUC 77-42 en 40.612 ha cultivadas, la incidencia ponderada resultante fue del 30,53% (Fig. 2.8). Finalmente, la provincia de Tucumán tuvo una incidencia de SCYLV del 14% y al ser ponderada por la superficie ocupada por LCP 85-384, TUCCP 77-42 y RA 87-3 en 265.250 ha ocupadas con caña de azúcar en la provincia (a la fecha de los muestreos), la incidencia ponderada obtenida ascendió al 14,59% (Fig. 2.8).

Tabla 2 4. Ponderación de la incidencia de SCYLV en las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy. Por provincia se detallan las variedades muestreadas, la superficie (en ha) ocupadas por cada variedad y el porcentaje de ocupación provincial. El cálculo de Incidencia ponderada (%) surge de la multiplicación de los valores de las columnas n° 4 y 5.

| Provincia | Variedad | Superficie (Ha) | % Sup total* | Incidencia (%) | Incidencia ponderada (%) |
|-----------|------------|-----------------|--------------|----------------|--------------------------|
| Tucumán | LCP 85-384 | 22.0290 | 0,83 | 17,1 | 14,17 |
| | TUC 77-42 | 31.113 | 0,12 | 2,2 | 0,26 |
| | RA 87-3 | 3.501 | 0,013 | 12,5 | 0,16 |
| | OTRAS | 10.346 | 0,037 | | |
| | * | 26.5250 | | | 14,59 |
| Salta | LCP 85-384 | 4.530 | 0,162 | 2,5 | 0,41 |
| | NA 90-1001 | 2.297 | 0,082 | 25,6 | 2,10 |
| | NA 96-2929 | 142 | 0,005 | 3,3 | 0,02 |
| | NA 97-3152 | 8.147 | 0,291 | 7,8 | 2,28 |
| | NA 03-3300 | 200 | 0,007 | 2,2 | 0,02 |
| | NA 05-860 | 100 | 0,004 | 86,7 | 0,35 |
| | OTRAS | 12.584 | 0,449 | | |
| | * | 28.000 | | | 5,16 |
| Jujuy | LCP 85-384 | 4.333 | 0,11 | 53,1 | 5,67 |
| | NA 90-1001 | 5.676 | 0,14 | 74,8 | 10,45 |
| | NA 96-2929 | 4.878 | 0,12 | 59,3 | 7,13 |
| | CP 70-1133 | 5.770 | 0,14 | 31,6 | 4,49 |
| | TUC 77-42 | 12.546 | 0,31 | 9,0 | 2,80 |
| | otras | 7.409 | 0,18 | | |
| | * | 40.612 | | | 30,53 |

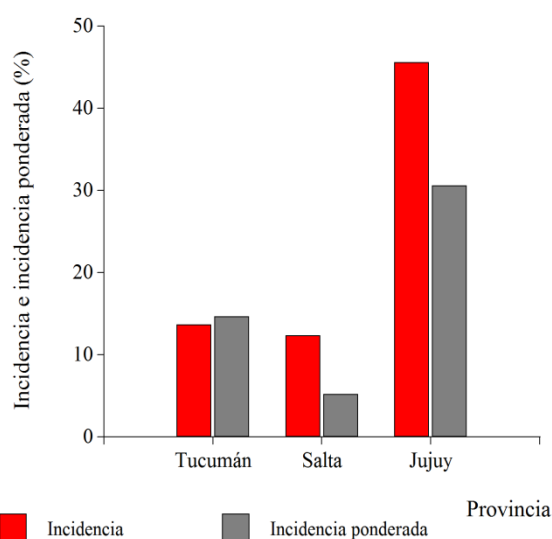


Figura 2 8. Incidencia e incidencia ponderada de SCYLV en las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy.

Las muestras colectadas al azar que resultaron tener síntomas visibles de la enfermedad (Fig. 2.9) fueron en total 19 de 4.184 hojas. De las 19 muestras sintomáticas, 5 fueron detectadas como positivas a SCYLV mediante TBIA y 14 como negativas al virus. Por otro lado, de las 4.165 muestras asintomáticas, 892 tuvieron reacción positiva en el TBIA y 3.273 reacción negativa. Los resultados obtenidos en las tablas de contingencia realizadas en el programa estadístico InfoStat demostraron que no hay asociación estadísticamente significativa entre la presencia del virus y la expresión de síntomas visuales ($P>0,05$) (Tabla 2.5).



Figura 2 9. Foto tomada a campo durante los muestreos donde se observan tres muestras colectadas con síntomas de amarillamiento de la nervadura central en el envés de hojas de caña de azúcar (superiores) y tres muestras sin expresión de síntomas (inferiores).

Tabla 2 5. Tabla de contingencia con clasificación cruzada de datos categorizados realizada mediante el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo et al., 2017). Las frecuencias absolutas de la ausencia (0) y presencia (1) de síntomas se muestra en columnas, mientras que las frecuencias absolutas de la ausencia (0) y presencia (1) de SCYLV se muestra en filas.

| SCYLV | 0 | 1 | Total |
|-------|-------------|-----------|-------------|
| 0 | 3273 | 14 | 3287 |
| 1 | 892 | 5 | 897 |
| Total | 4165 | 19 | 4184 |

| Estadístico | Valor | gl | p |
|----------------------|-------|----|---------------|
| Chi Cuadrado Pearson | 0,27 | 1 | 0,6036 |
| Chi Cuadrado MV-G2 | 0,26 | 1 | 0,6126 |
| Coef.Conting.Cramer | 0,01 | | |
| Coef.Conting.Pearson | 0,01 | | |

Los mapas de interpolación de la incidencia de SCYLV en la provincia de Tucumán reflejaron áreas de mayor incidencia del virus (valores superiores al 40%) distribuidos principalmente entre los departamentos Tafí Viejo, Lules, Famaillá y en menor grado los departamentos Cruz Alta, Chicligasta y Simoca (Fig. 2.10). Por el contrario, los departamentos Monteros, Leales y Burruyacu mostraron una menor incidencia del virus como resultado de la interpolación (Fig. 2.10). En relación a los mapas tridimensionales elaborados en función de los lotes muestreados en los ingenios Ledesma (Jujuy) y San Martín del Tabacal (Salta); se observó un amplio rango de incidencia (del 0 al 100%) en Jujuy, con un marcado foco de infección (Fig. 2.11). En cuanto que en la provincia de Salta, las incidencias observadas según la escala de color (Fig. 2.12) quedaron comprendidas en el rango del 0 al 60%, donde el 78,6% de los lotes observados presentó una incidencia de SCYLV menor al 10%. A partir de la interpolación de los valores de incidencia obtenidos, se observa en Salta un pequeño foco de infección con valores cercanos al 60% y una distribución homogénea de baja incidencia en el resto de las coordenadas muestreadas.

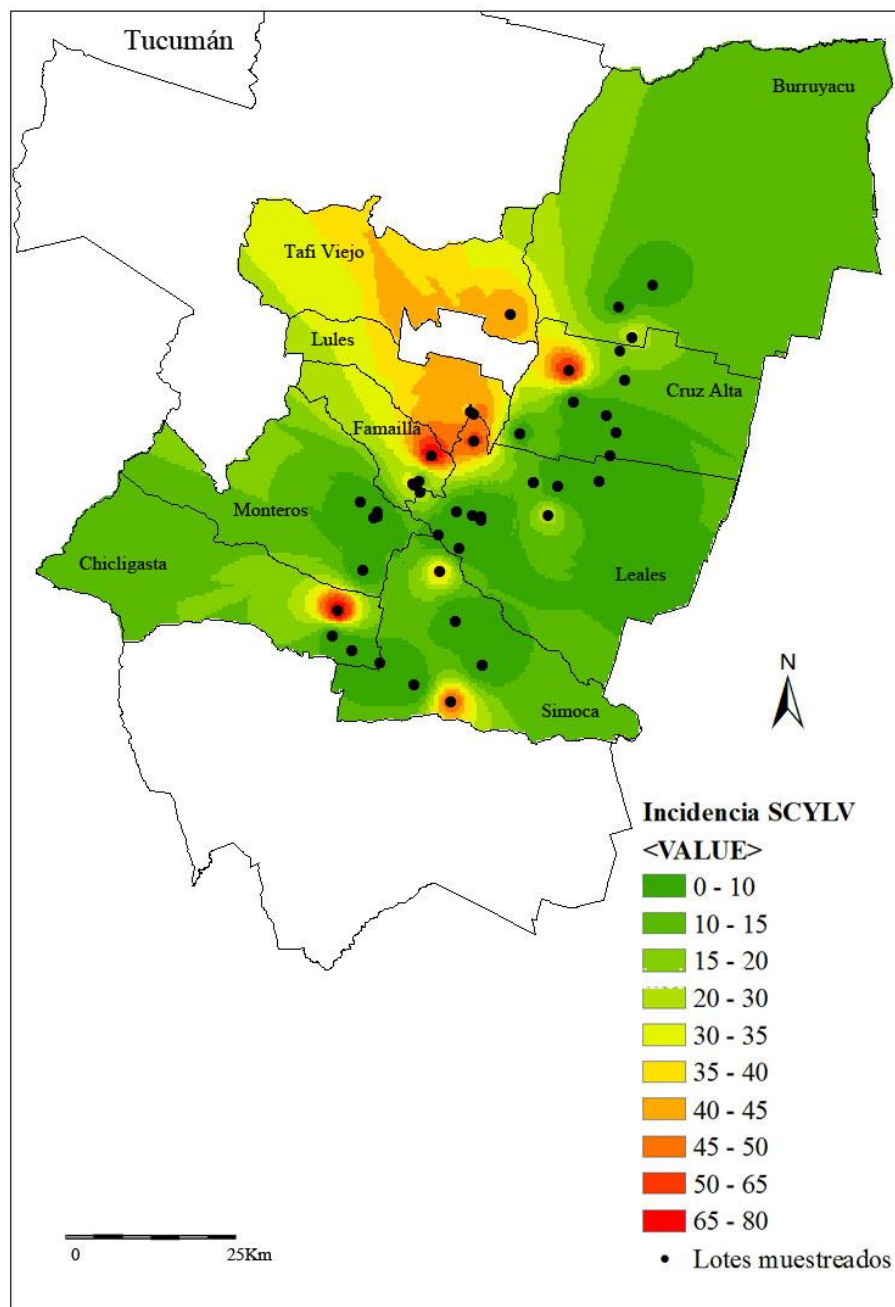


Figura 2 10. Mapa de interpolación de la incidencia de SCYLV en los departamentos muestreados de Tucumán, mediante el método IDW (potencia = 2) programa ArcGis 10.1 (Esri, 2010).

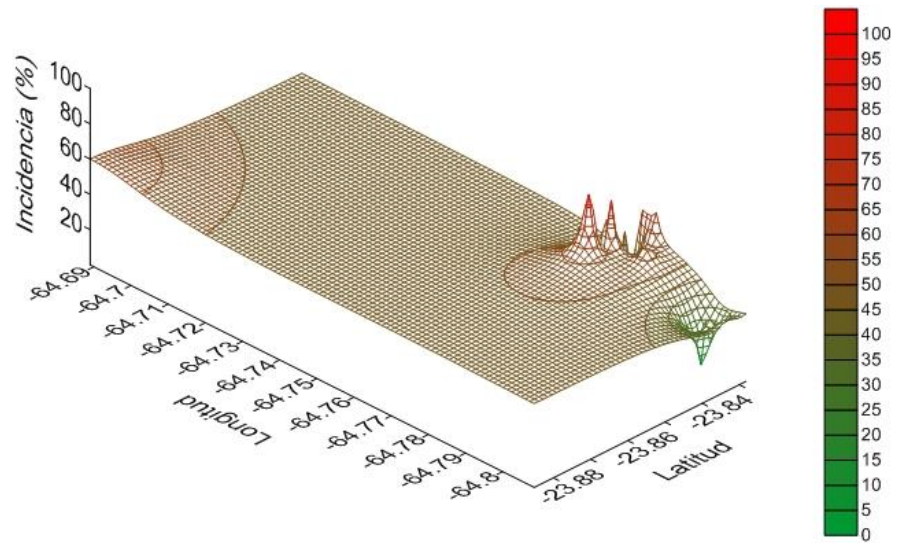


Figura 2 11. Mapa geoestadístico interpolativo tridimensional de la dispersión del amarillamiento de la caña de azúcar en el ingenio Ledesma (Jujuy) en función de la incidencia de SCYLV. Programa Surfer 10.

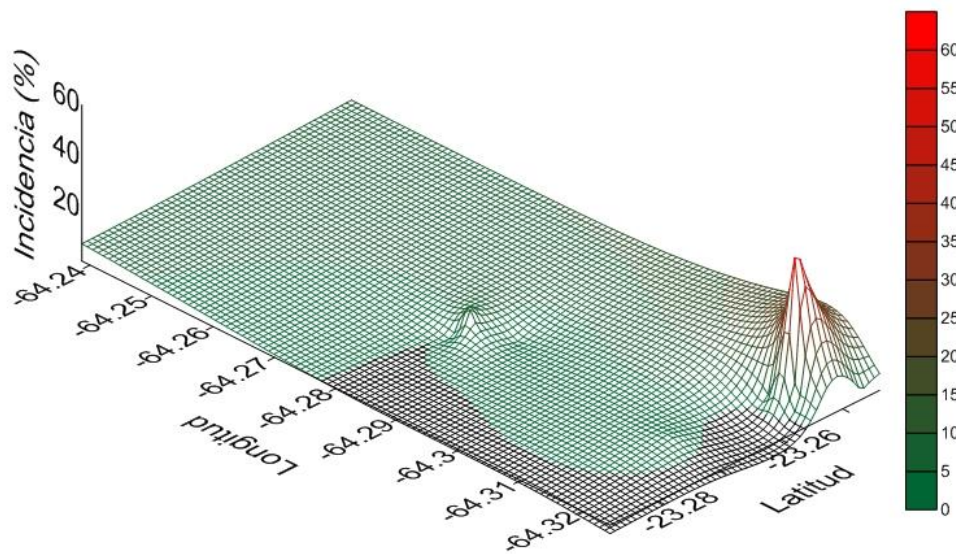


Figura 2 12. Mapa geoestadístico interpolativo tridimensional de la dispersión del amarillamiento de la caña de azúcar en el ingenio San Martín del Tabacal (Salta) en función de la incidencia de SCYLV. Programa Surfer 10.

Discusión

Al estudiar la distribución de SCYLV en el cultivo de caña de azúcar se detectó una incidencia del 12 al 45% y una prevalencia del virus del 46 al 83% en las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy (Fig. 2.6). Los resultados obtenidos en la región NOA evidencian una alta incidencia del virus en comparación con las detecciones realizadas en otros países productores de caña de azúcar, tales como Colombia (17,7% incidencia), Isla Mauricio (27%), India y Sri Lanka (33%), China (0,5-10%) y Tailandia (27%) (Victoria *et al.*, 1999; Moutia y Saumtally, 1999; Rao *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2006; Lehrer *et al.*, 2008). Por otra parte, investigaciones llevadas a cabo en Isla Mauricio, Venezuela, Isla Reunión, Cuba y Kenia, revelaron valores elevados de incidencia similares a los detectados en este estudio (Moutia y Saumtally, 1999; Lopez *et al.*, 2004; Rassaby *et al.*, 1999; Aday Díaz *et al.*, 2014b; Amata *et al.*, 2016). El porcentaje de incidencia detectado por Bertani *et al.* (2014) en la provincia de Tucumán (19,46%) queda comprendido dentro del rango de incidencia detectado en los muestreos realizados en esta tesis en el NOA (12 al 45%), siendo mayor que el que se detecta en Tucumán (14%). En cuanto a la prevalencia detectada, se observa una similitud con lo ocurrido en otros países donde se estudió el virus, encontrando una amplia distribución del mismo (Victoria Kafure *et al.*, 1998; Victoria *et al.*, 1999; Moutia y Saumtally, 1999; Khoodoo *et al.*, 2010; Comstock *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2011; Lopez *et al.*, 2004; Aday Díaz *et al.*, 2014a).

La alta incidencia y prevalencia detectada en las variedades NA 96-2929, NA 90-1001 y NA 05-860 (>50% de incidencia y 100% de prevalencia) evidencian una alta susceptibilidad ante la presencia del virus. Bajo el mismo fundamento, las variedades NA 03-300, TUC 77-42 y NA 97-3152 se presentarían como resistentes y CP 70-1133, LCP 85-384, RA 87-3 como medianamente resistentes. Estudios sobre la resistencia de distintas variedades de caña de azúcar ante la presencia de SCYLV fueron llevados a cabo en Cuba, concluyendo que los individuos testeados como positivos al virus, son susceptibles y los individuos resistentes son aquellos que a pesar de estar expuestos a la infección natural y a una alta fuente de inóculo, no mostraron síntomas y dieron negativos a SCYLV mediante TBIA (Aday Díaz *et al.*, 2014c). Pero al relacionar las variedades con las provincias en donde fueron

tomadas las muestras, se observan amplios rangos de variación de la susceptibilidad a SCYLV dentro de una misma variedad colectada en diferentes provincias: por ejemplo, la variedad LCP 85-384 presentó una incidencia del 2,5% en Salta, 17,1% en Tucumán y 53,1% en Jujuy; la variedad NA 96-2929 tuvo una incidencia del 3,3% en Salta pero en Jujuy alcanzó un valor del 59,3 %; la variedad TUC 77-42 en Tucumán presentó una incidencia del 2,2% y en Jujuy del 9,0% y finalmente se observó una incidencia del 25,6% en Salta y del 74,8% en Jujuy para la variedad NA 90-1001 (Tabla 2.3). Existe la hipótesis de que la zona donde se desarrolla el cultivo influye en las condiciones predisponentes para la manifestación de la enfermedad, por ejemplo en la dinámica del vector, el origen de la caña semilla utilizada y propagación a partir de material vegetal infectado, la presencia de diferentes razas virales con distintos grados de patogenicidad, variedades comerciales susceptibles, entre otras. Esta hipótesis también daría respuesta al amplio rango de porcentajes de incidencia y prevalencia detectados en el NOA, evidenciando una alta variación en la distribución del virus entre las provincias muestreadas. Dentro de dichas condiciones predisponentes a la enfermedad, Lopez *et al.* (2004) afirman que existe una dependencia significativa entre la presencia de SCYLV y la procedencia del material ($P= 0,00035$), encontrando la mayor prevalencia del virus en el banco de germoplasma. En relación a la dispersión del virus por pulgones, estudios realizados en Hawái indican que la enfermedad tiene un progreso lento en el campo debido a que los pulgones que la transmiten se mueven lenta y esporádicamente (en el rango de unos pocos metros por año). Concluyendo que una situación análoga puede ocurrir en zonas de producción de caña de azúcar con características geográficas y climáticas similares (Lehrer *et al.*, 2007). Por el contrario, otros estudios indican que las poblaciones de pulgones tienen una alta correlación con el progreso de la enfermedad. Investigaciones realizadas en India concluyen que plantas libres de SCYLV se infectan rápidamente a partir de áfidos provenientes de lotes de caña de azúcar cercanos infectados con el virus (Chinaraja y Viswanathan., 2015). En adición a esto, existen estudios que evidenciaron un gran incremento temporal de la infección viral durante la primavera/verano en coincidencia con el inicio de la infección e incremento del virus vector (M. Sacchari) en Louisiana (McAllister *et al.*, 2008). En cuanto a la influencia de las razas virales presentes, Abu Ahmad *et al.* (2007), detectan

distintos grados de patogenicidad al evaluar la severidad en cada genotipo o combinación de genotipos.

Al ponderar la incidencia de SCYLV de cada variedad muestreada por la superficie que cada una ocupa y luego realizar la sumatoria por provincias, surge el concepto de incidencia ponderada del virus por provincia. Esta ponderación se lleva a cabo entre técnicos cañeros, a los fines de dar recomendaciones prácticas sobre el impacto de la enfermedad en las zonas de producción. De esta forma, se observa que al ponderar la incidencia, la misma disminuyó en un 33,63% en Jujuy (46 a 30,53%;), en un 57% en Salta (12 a 5,16%) y sufrió un incremento en relación a la incidencia sin ponderar del 4,21% en Tucumán (14 a 14,59%). Las disminuciones en la incidencia al ser ponderada por la superficie de cada variedad, se atribuyen al escaso porcentaje que ocupa cada una de ellas en la superficie cañera de Salta y Jujuy, minimizando el efecto de la incidencia en la epidemiología de la enfermedad. Cabe destacar que estos resultados debieran complementarse con estudios sobre la patogenicidad de las razas virales presentes y el efecto de SCYLV en el rendimiento industrial de la caña de azúcar. Por otro lado, el incremento sufrido en la incidencia ponderada de Tucumán probablemente sea a causa del porcentaje que ocupa la variedad LCP 85-384 dentro del total de hectáreas cañeras de Tucumán (83%). Esto es un resultado a destacar, debido a que la gran cantidad de hectáreas destinadas a una sola variedad, incrementan el riesgo epidemiológico de dispersión de la enfermedad.

Los mapas de interpolación de la incidencia son de fundamental importancia para los estudios epidemiológicos de la enfermedad, debido a que nos permiten estimar la incidencia del virus en zonas no muestreadas bajo el supuesto de que la variable representada cartográficamente (incidencia) disminuye su influencia a mayor distancia desde su ubicación de muestra. La interpolación de la incidencia graficada en la Fig. 2.10, muestra en Tucumán diferentes zonas donde el rango de incidencia varía del 0-10% hasta un 65-80%. Estos resultados alertan sobre una alta incidencia de SCYLV en los departamentos de Tafí Viejo, Lules, Famaillá, Cruz Alta, Chicligasta y Simoca. Para que estos resultados sirvan para aplicaciones prácticas de manejo, es necesario que sean complementados con información acerca de población de vectores, condiciones climáticas predisponentes, origen de la caña semilla empleada, entre otros. Con respecto a los mapas de interpolación de la incidencia obtenidos en Jujuy y Salta (Fig. 2.11 y 2.12) se observan pequeños

focos de infección en ambos ingenios muestreados concluyendo que es necesario el control de las condiciones predisponentes de la enfermedad para que no se propague el vector y material infectado hacia zonas libre de virus.

La ausencia de asociación estadísticamente significativa entre la expresión de síntomas visibles de la enfermedad y la presencia de SCYLV (Tab. 2.5) convierte al amarillamiento en un riesgo para el rendimiento de la caña de azúcar, debido a que muchos técnicos y productores desconocen la presencia de la enfermedad en el cultivo, con la consecuente disminución del rendimiento sacarino en industria a causa de la presencia de SCYLV en los haces floemáticos de la caña. La falta de asociación detectada concuerda con los resultados obtenidos por otros autores (Moutia y Sauntally, 1999; Victoria *et al.*, 1999; Aday Diaz *et al.*, 2014a) aunque existe la hipótesis de que la baja sensibilidad de la técnica de diagnóstico empleada (TBIA) no permite detectar a SCYLV en bajas concentraciones en la planta, provocando la aparición de falsos negativos (Zhu *et al.*, 2010).

Conclusiones del capítulo

- *Sugarcane yellow leaf virus* está ampliamente distribuido en la principal región productora de caña de azúcar del país, con un rango de incidencia del 12 al 45% y de prevalencia del 46 al 83%.
- La variación de la incidencia y prevalencia de SCYLV entre provincias probablemente se deba a las condiciones predisponentes para la manifestación de la enfermedad en cada zona productiva, tales como: dinámica del vector, el origen de la caña semilla utilizada y propagación a partir de material vegetal infectado, la presencia de diferentes razas virales con distintos grados de patogenicidad, variedades comerciales susceptibles, entre otras.
- Existen distintos grados de susceptibilidad al virus entre las distintas variedades muestreadas.
- Al ponderar la incidencia del virus por la superficie ocupada por cada variedad muestreada, se obtienen valores de incidencia menor en Salta y Jujuy, lo que ayuda a dimensionar el impacto de la enfermedad en la región.
- El pequeño incremento de la incidencia en Tucumán, al ser ponderada por la superficie empleada de cada una de las variedades muestreadas, refleja la importancia de diversificar la composición varietal de la provincia.
- No hay asociación estadísticamente significativa entre la expresión de síntomas visuales y la presencia de SCYLV, lo cual dificulta el diagnóstico y manejo de la enfermedad.

Antecedentes

La etiología de Yellow leaf syndrome (YLS) ha estado en duda durante un tiempo. En un principio se sugirió que las causas eran estrictamente abióticas, como compactación de suelos, desbalance nutricional, entre otros; pero después, al estudiar los patrones de distribución del síndrome en el campo, se comenzó a creer que las causas eran más bien de índole bióticas con la participación de un agente transmisible (Lockhart *et al.* 1996). Lo cual más adelante se comprueba con los estudios de Vega *et al.* (1997) quienes mediante microscopía óptica y electrónica combinada con serología utilizando antisuero de *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) serotipo PAV, encuentran evidencias de que muestras con Sugarcane yellow leaf disease (SCYLD) tenían una etiología viral perteneciente al género luteovirus. Encontrando algunas diferencias entre ambos, ya que el BYDV se aloja en células cribosas y parenquimáticas, está ubicado en el núcleo y además se asocia a partículas filamentosas. Por el contrario, el virus detectado en muestras con SCYLD se aloja en células acompañantes del floema, ubicado en citoplasma y no se encontraron evidencias de asociación con partículas filamentosas. De esta forma, denominan al agente causal como SCYLD-associated virus (SCYLaV) y concluyen que es necesario seguir con las caracterizaciones del virus, encontrar un método de diagnóstico específico y finalmente identificar el modo de transmisión.

Scagliusi y Lockhart (2000) reafirman la teoría de que SCYLV es un luteovirus que se asemeja a otros miembros del género en cuanto a propiedades de la partícula, transmisión por áfidos pero no por inoculación mecánica, y en cuanto a las propiedades del genoma y de la cápside proteica también encuentran similitudes. Pero en su estudio sobre transmisión encuentran que SCYLV no es transmitido por *M. sacchari* ni tampoco por *R. maidis* desde caña de azúcar a avena, la cual es altamente susceptible a infecciones causadas por BYDV. Estas observaciones respaldan la conclusión de que SCYLV y BYDV son luteovirus biológicamente distintos, con un grado limitado de relación antigénica.

Posteriormente Smith *et al.* (2000) observan que las similitudes de los genomas de SCYLV y BYDV son sólo en una pequeña porción, y que las otras partes del genoma de SCYLV tienen afinidades más cercanas a genomas de otros miembros

de la familia Luteoviridae. El ORF 1 y 2 se asemejan a *Potato leaf roll virus* (PLRV; género Polerovirus), el ORF 3 y 4 a *Barley yellow dwarf virus-PAV* (BYDV-PAV; género Luteovirus) y el ORF 5 a *Pea enation mosaic virus* (PEMV; género Enamovirus), sugiriendo que esas relaciones resultaron de eventos previos de recombinación entre especies de los distintos géneros de la familia. Maia *et al.* (2000) mediante análisis filogenético, estudian las secuencias de aminoácidos pertenecientes a la cápside proteica (CP) y a la región RNA dependiente de la RNA polimerasa (RdRp) de distintos aislamientos de SCYLV, arribando a la misma conclusión que Smith *et al.* (2000), donde la CP de SCYLV se agrupa con el género Luteovirus y la RdRp con el género Polerovirus; aunque afirman que para un mejor entendimiento de la filogenia del virus sería necesario trabajar sobre una secuencia completa del mismo. Moonan *et al.* (2000) obtienen la primera secuencia completa de SCYLV y mediante el programa de computación PLATO (*partial likelihoods assessed through optimization*) analizan la variación intergénica e intragénica dentro de un modelo filogenético para dilucidar el origen recombinante del virus a partir de sus ancestros; concluyendo que SCYLV pertenece al género Polerovirus (Fig.3.1). En el año 2004 el Comité internacional de taxonomía de virus (en inglés ICTV) toma como referencia los trabajos de Smith *et al.* (2000) y Moonan *et al.* (2000) para proponer a SCYLV como especie miembro del género Polerovirus al cumplir con los criterios de demarcación de especies dentro del género.

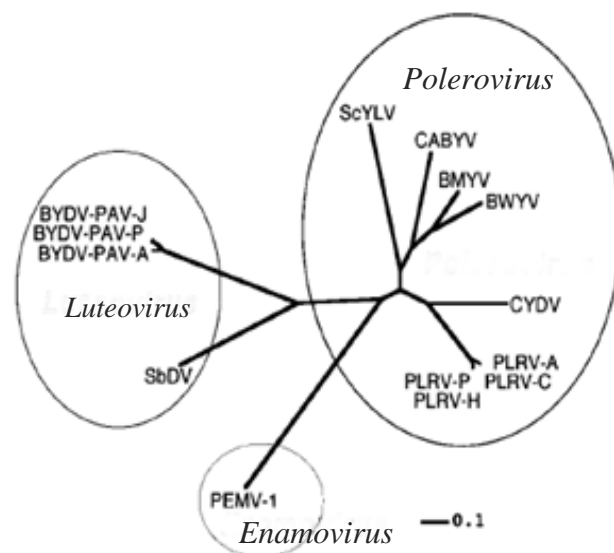


Figura 3 1. Árbol filogenético radial sin raíces a partir de 14 secuencias nucleotídicas de especies virales pertenecientes a la familia Luteoviridae alineadas con Clustal X y construido mediante análisis de máxima verosimilitud con DNAmI de Philip v. 3.57c y TreeView. Los géneros Polerovirus, Luteovirus y Enamovirus están individualmente encerrados en círculos. La escala utilizada se encuentra en la figura. Tomado de Moonan *et al.* (2000).

Los resultados de estos estudios indican que SCYLV, al igual que todas las especies miembro del género Polerovirus, poseen una organización genómica de al menos 6 marcos abiertos de lectura definidos (ORF) listados como ORF 0 a 5. El ORF 0 codifica una proteína de 28-30 KDa que actúa como supresor de silenciamiento del ARN. El ORF 0 se superpone con el ORF 1, el cual codifica una proteína de 66-72 KDa encargada de la replicación (VPg). A su vez, el ORF 1 y 2 se superponen y juntos codifican una proteína de 116-121 KDa relacionadas con la replicación del virus, denominadas RNA dependiente de la RNA polimerasa (RdRp). La cápside proteica (CP) mayor es codificada por el ORF 3 con un tamaño de 22-23 KDa. El producto del ORF 4 es requerido para el movimiento en largas distancias, denominado MP y tiene un tamaño de 17-21 KDa. Finalmente el ORF 5 codifica en conjunto al ORF 3, la cápside proteica menor, de 67-80 KDa, responsable posiblemente de la transmisión por áfidos (ATF) y el factor de estabilidad de las partículas virales (King *et al.*, 2012). En la figura 3.2 se muestra la organización genómica de PLRV, miembro y especie tipo del género Polerovirus.

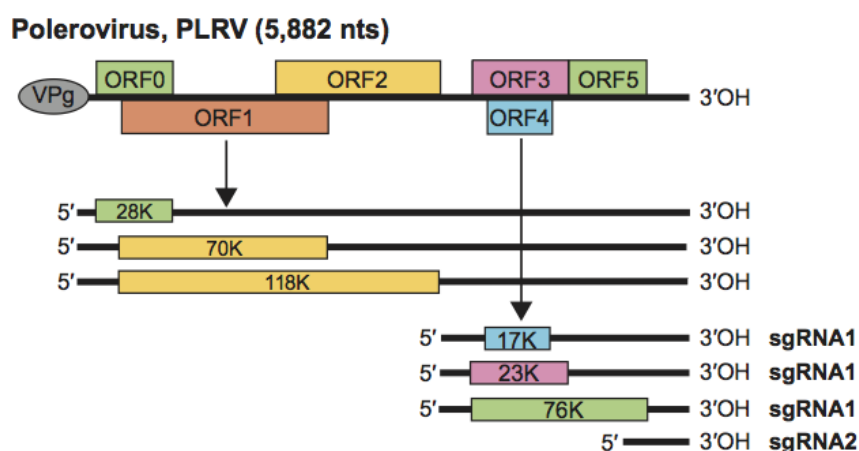


Figura 3 2. Organización genómica de *Potato leafroll virus* (PLRV). Tomado de King *et al.*, 2012.

Moonan y Mirkov (2002) analizaron la diversidad genotípica de SCYLV detectando que la diversidad de la secuencia del SCYLV es menor en los ORF 3, 4 y 5; baja a intermedia en el ORF 1 y extremo 5' del ORF 2; siendo la mayor diversidad genómica detectada en el extremo 3' del ORF 2. Estos autores tomaron muestras de caña de azúcar con síntomas de SCYLD provenientes de las regiones Norte, Centro y Sur de América y analizaron la diversidad genotípica de SCYLV encontrando que un grupo de aislamientos provenientes de Colombia formaban

parte del origen filogenético de todas las muestras y lo denominaron COL. Con el correr de los años, esta diversidad intraespecífica del SCYLV ha llevado a que se detecte una gran cantidad de razas virales, denominadas genotipos.

Abu Ahmad *et al.* (2006a), secuencian el genoma completo de 5 aislamientos de SCYLV provenientes de Isla Reunión (2), Brasil (1), China (1) y Perú (1); Detectando al menos 3 genotipos virales diferentes mediante análisis filogenético de las secuencias. Dependiendo de la región genómica analizada, los aislamientos del virus se clasificaron dentro de uno o tres grupos filogenéticos, o bien se diferenciaron como un único genotipo. Los tres genotipos detectados fueron: BRA (proveniente de Brasil, donde la enfermedad se describe inicialmente y donde ocurrieron pérdidas de rendimiento significativas), PER (proveniente de Perú, primer país donde se detecta este genotipo) y REU (proveniente de Isla Reunión, primer lugar donde se detecta este genotipo). En complemento a los resultados obtenidos, Abu Ahmad *et al.* (2006b), diseñan cebadores específicos para la detección de cuatro genotipos virales (BRA-Brasil, CUB-Cuba, PER-Perú, y REU-Isla Reunión), cada par de cebadores amplifica un fragmento específico de cada genotipo, a excepción de los genotipos BRA y PER que debido a su estrecha relación filogenética, se decide agruparlos en un único genotipo denominado de ahora en adelante como BRA-PER, siendo su detección mediante un único par de cebadores. Estos cebadores se utilizaron en un RT-PCR para la identificación de los genotipos virales presentes en 245 muestras de hoja infectadas con SCYLV provenientes de 18 localidades productoras de caña distribuidas por todo el mundo. Todos los genotipos fueron detectados, en su mayoría en infecciones simples aunque se encontraron casos de infecciones mixtas. A estos 4 genotipos, se agrega en el año 2008 un quinto, denominado IND por su origen en India. A partir de estudios realizados por Viswanathan *et al.* (2008), que al buscar los genotipos BRA-PER, CUB y REU en India encuentran que los aislamientos de su país presentaban variaciones en el genoma con respecto a los aislamientos de la base de datos (incluso en las regiones menos variable del genoma de SCYLV). Concluyendo que la población que se encuentra en India es significativamente diferente del resto del mundo, denominando a esos aislamientos, como genotipo IND. Por otra parte, diversos estudios realizados con aislamientos provenientes de China, detectan 3 nuevos genotipos los cuales se denominaron: CHN1, CHN2 y CHN3 (Wang y Zhou, 2010; Wang *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2014). Finalmente,

ElSayed *et al.* (2011) realizan análisis filogenéticos incluyendo aislamientos de SCYLV provenientes de Hawái y observan un acercamiento de éstos con los aislamientos del genotipo PER, separadamente de los genotipos BRA y REU. Proponiendo que el genotipo HAW se considere un grupo independiente junto al genotipo PER, denominando a estos genotipos como HAW-PER.

En Argentina, solo se ha detectado el genotipo BRA-PER. Cafrune *et al.* (2012) lo identifican mediante RT-PCR en plantas sintomáticas y asintomáticas en lotes comerciales y en la colección de germoplasma de INTA-Famaillá, ambas provenientes de Tucumán. Bertani *et al.* (2014) lo detectan dentro de 29 muestras positivas a SCYLV colectadas en Tucumán y Salta.

La variabilidad en el progreso de la enfermedad y su severidad puede ser atribuida a factores bióticos o abióticos, pero también puede ser a causa de variaciones propias del patógeno. Abu Ahmad *et al.* (2007a) realizaron estudios sobre la significancia biológica de la ocurrencia de distintos genotipos de SCYLV, haciendo hincapié en la capacidad de infección (transmisión y grado de infección) y virulencia (capacidad de causar síntomas en hoja) del virus. Para ello, una primera parte del experimento se realizó en Isla Reunión y en Guadalupe, donde se transmitió el virus desde plantas infectadas con SCYLV hacia tejido de cultivo sano mediante el áfido vector *Melanaphis sacchari*. La segunda etapa consistió en el traslado de las plantas a Francia, donde crecieron bajo condiciones controladas en invernadero y casi sin riesgo de contaminación cruzada (*M. sacchari* no existe en Francia continental y *R. maidis* no coloniza caña de azúcar en las condiciones locales donde se desarrolló el experimento). La presencia de SCYLV en las plantas se comprobó mediante TBIA y la detección de genotipos se realizó mediante RT-PCR, ambos después de los 5 a 6 meses. El porcentaje de plantas infectadas y plantas sintomáticas inoculadas con el genotipo CUB fue mayor que el porcentaje de plantas inoculadas con el genotipo BRA-PER y REU. Entre los genotipos BRA-PER y REU, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a su capacidad de infección pero si en relación a su virulencia. El genotipo REU prácticamente no causó síntomas en las plantas inoculadas, siendo que el 15 a 25% de las plantas inoculadas con BRA-PER fueron sintomáticas. Por lo tanto, el genotipo BRA-PER es una raza más agresiva que el genotipo REU; este resultado se complementa con estudios posteriores del mismo investigador (Abu Ahmad *et al.*, 2007b) quien al estudiar el comportamiento de los cuatro genotipos en dos variedades provenientes

de diferentes zonas de producción del mundo, detecta que el genotipo BRA-PER en combinación con el genotipo REU es más agresiva que BRA-PER solo. Estos resultados son obtenidos mediante una escala de síntomas del 0-5 que permite la evaluación de severidad detectada en cada genotipo o combinación de genotipos.

Objetivo

Identificar los genotipos virales de SCYLV presentes en las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy y la distribución de los mismos en el área analizada.

Materiales y Métodos

- Material vegetal

Dentro de las 897 muestras de hoja detectadas como positivas a SCYLV mediante TBIA (muestreos 2015 y 2016), se seleccionaron 50 muestras al azar para identificar mediante RT-PCR si los genotipos BRA-PER, CUB y REU estaban presentes. En la tabla 3.1 se resume la procedencia, variedades muestreadas y cantidad de muestras colectadas.

Tabla 3 1. Descripción de 50 muestras positivas a SCYLV (mediante TBIA) colectadas durante los muestreos 2015 y 2016 en el Noroeste Argentino.

| Provincia | Variedad | N° muestras |
|---------------------------|------------|----------------|
| Tucumán | LCP 85-384 | 10 |
| | RA 87-3 | 1 |
| Salta | LCP 85-384 | 3 |
| | NA 90-1001 | 3 |
| | NA 96-2929 | 2 |
| | NA 97-3152 | 3 |
| | NA 03-3300 | 2 |
| | NA 05-860 | 1 |
| Jujuy | LCP 85-384 | 6 |
| | NA 90-1001 | 7 |
| | NA 96-2929 | 7 |
| | TUC 77-42 | 1 |
| | CP 70-1133 | 4 |
| Total muestras analizadas | | 50 |

- Extracción de ácidos nucleicos totales

Mediante el método CTAB modificado de Doyle y Doyle (1987), se realizó la extracción de ácidos nucleicos totales a las 50 muestras seleccionadas. El método consistió en macerar 0,05 gr de hoja en nitrógeno líquido para romper las uniones entre las células y facilitar la interacción con las soluciones de lisis que ayudan a liberar el material genético. Seguido a esto, se agregan 500 µl de buffer CTAB al 2% para precipitar los ácidos nucleicos y para evitar la oxidación de las muestras se agrega un 2% de β- mercaptoetanol. Posteriormente las muestras se incubaron a 60°C durante 20 min en baño térmico. Mediante el agregado de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) se diluyen los compuestos covalentes, principalmente lípidos. Esto se realiza dos veces, intercalado con una centrifugación de 5 min a 10.000 rpm. El sobrenadante obtenido se mezcla con 1/10 vol de acetato de sodio 3M pH 5,2 y 2,5 vol de etanol absoluto para obtener la precipitación de los ácidos nucleicos. Finalmente las muestras se incubaron a -70°C durante 40 min con una posterior centrifugación a 12.000 rpm durante 30 min. En esta instancia, se descarta el líquido y se conserva el pellet formado, el cual se lavó con 1 ml de etanol al 70%, se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min y se resuspendió en 25 µl de Dietil policarbonato (DEPC). Se cuantificó la concentración de los ácidos nucleicos obtenidos mediante la utilización de un espectrofotómetro (NanoDrop), el procedimiento se realizó según las especificaciones del fabricante. El almacenamiento de los ácidos nucleicos obtenidos se realizó a -80°C.

- RT-PCR

Se realizó un RT-PCR con cebadores específicos para cada genotipo, diseñados por Abu Ahmad *et al.* (2006b). Para la detección del genotipo viral BRA-PER, los cebadores empleados tuvieron las siguientes características, BRA-PER-Forward (posición 1.905 a 1.924 pb): 5'-AACTGCTGCGTCAGGCCCA-3'. BRA-PER-Reverse (posición 2.267 a 2.246 pb): 5'-GACGAGCTTGCGTTGTTTTTCT-3'. Para la detección del genotipo CUB, las características de los cebadores empleados fueron: CUB-Forward (posición 423 a 443 pb): 5'-GTGCTTCTCCCGCGGTTCACT-3'. CUB-Reverse (posición 873 a 853 pb): 5'-ATTCGAGAACAACCTCCGCCTC-3'. Finalmente, las características del par de

cebadores empleado para la detección del genotipo REU fueron las siguientes: REU-Forward (posición 3.540 a 3.558 pb): 5'- CAAGCTTCTAGCGGGAATC-3'. REU-Reverse (posición 4.445 a 4.427 pb): 5'- CAGTTGCTCaATGCTCCAcG-3'. La mix del RT-PCR tuvo un volumen final de 25 µl y consistió en: 1 µl de ARN eluido, 5 µl de buffer AMV/Tfl 5×, 2 µl de MgSO₄ 25 mM, 0,6 µl de dNTP 10 mM, 0,6 µl de cada cebador (100 µM), 0,6 µl de enzima AMV Transcriptasa reversa, 0,6 µl de enzima Tfl ADN Polimerasa y agua DEPC hasta alcanzar el volumen final. Para los tres genotipos en estudio se utilizó el mismo programa de ciclado, el cual consistió en 48°C durante 60 min para la transcripción reversa; seguido de una primera desnaturalización del ADN a 94° durante 2 min; 35 ciclos de 94°C durante 15 seg para desnaturalizar el ADN, 61°C durante 2 min para la hibridación de los cebadores a cada una de las cadenas del ADN desnaturalizado y 68°C durante 2 min para la extensión de los cebadores mediante una ADN polimerasa termoestable; con una extensión final de 68°C durante 10 min.

- Gel de agarosa 2%

Mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X, se realizó la separación por tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos mediante RT-PCR, esperando encontrar bandas de 362, 450 y 905 pb para los genotipos BRA-PER, CUB y REU, respectivamente. Para constatar el tamaño de banda obtenido se utilizó un marcador de peso molecular (Promega) que marca desde 100 pb hasta 1.000 pb en incrementos de a 100 pb. Los geles se tiñeron con GelRed™ (Biotium) y la visualización de las bandas se realizó bajo luz UV.

- Análisis de datos

A partir de las coordenadas geográficas de cada punto donde se tomaron las 50 muestras y mediante la aplicación ArcMap perteneciente al software ArcGIS (Versión 10.0) se elaboraron mapas que muestran la ubicación de dichas muestras, y mediante colores se diferenciaron los genotipos detectados. A su vez, los datos obtenidos se analizaron mediante el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2017) y se elaboraron gráficos de barras para mostrar los resultados. Finalmente se calcularon los valores de incidencia por variedad y por provincia, como el porcentaje de muestras detectadas con cada genotipo en el total de las muestras analizadas.

Resultados

Las 50 muestras en estudio, tienen como procedencia el departamento Orán (provincia de Salta), departamento Ledesma (provincia de Jujuy) y los departamentos: Simoca, Chicligasta, Leales, Famaillá, Lules, Cruz Alta y Burruyacu (provincia de Tucumán) (Fig. 3.3).

Como primera instancia se evaluaron las extracciones de ácidos nucleicos y su cuantificación en el espectrofotómetro se muestra en la tabla 3.2. Partiendo de esa calidad de extracciones, se realizaron los RT-PCR y geles de electroforesis para la visualización de bandas.

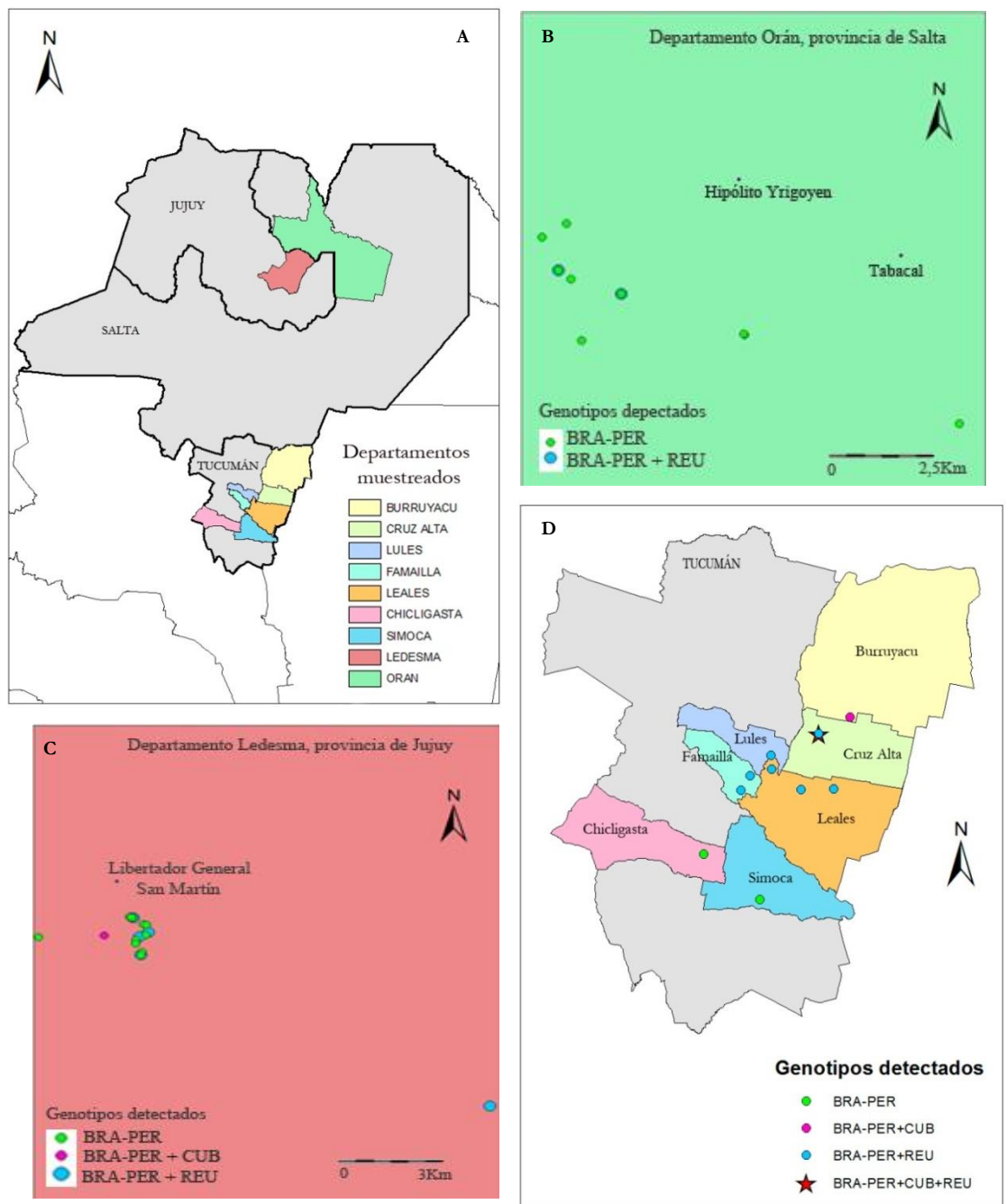


Figura 3 3. Mapas elaborados con la aplicación ArcMap perteneciente el software ArcGis versión 10.0. **A.** Ubicación de los departamentos muestreados en las provincias de Salta, Tucumán y Jujuy. **B.** Ubicación y detalle de los distintos genotipos detectados en el departamento Orán, provincia de Salta. **C.** Ubicación y detalle de los distintos genotipos detectados en el departamento Ledesma, provincia de Jujuy. **D.** Ubicación y detalle de los distintos genotipos detectados en 7 departamentos muestreados en la provincia de Tucumán.

Tabla 3 2. Detalle de la cuantificación de ácidos nucleicos totales obtenidos con el método de CTAB modificado de Doyle y Doyle (1987). Las 50 muestras se identificaron del 1 al 50 y la concentración de ácidos nucleicos se expresó en ng/μl.

| Muestra | ng/μl | Muestra | ng/μl | Muestra | ng/μl |
|---------|--------|---------|--------|---------|--------|
| agua | 0,98 | 17 | 208,84 | 34 | 42,9 |
| 1 | 184,02 | 18 | 186,84 | 35 | 42,03 |
| 2 | 335,72 | 19 | 254,65 | 36 | 21,37 |
| 3 | 442,83 | 20 | 134,6 | 37 | 69,84 |
| 4 | 664,72 | 21 | 71,32 | 38 | 32,5 |
| 5 | 382,85 | 22 | 218,04 | 39 | 50,98 |
| 6 | 453,97 | 23 | 189,99 | 40 | 205,38 |
| 7 | 426,26 | 24 | 14,3 | 41 | 54,42 |
| 8 | 443,49 | 25 | 187,08 | 42 | 67,74 |
| 9 | 164,2 | 26 | 61,34 | 43 | 104,18 |
| 10 | 95,98 | 27 | 196,86 | 44 | 88,84 |
| 11 | 410,73 | 28 | 142,22 | 45 | 52,97 |
| 12 | 277,82 | 29 | 39,07 | 46 | 94,45 |
| 13 | 685,06 | 30 | 207,04 | 47 | 24,82 |
| 14 | 233,9 | 31 | 172,05 | 48 | 124,85 |
| 15 | 212,64 | 32 | 77,8 | 49 | 80,97 |
| 16 | 274,33 | 33 | 151,09 | 50 | 97,63 |

De todos los geles realizados para la detección de 3 genotipos virales en 50 muestras, se decidió hacer tres geles resumen, donde se evidencien los resultados obtenidos, de esta manera, la Figura 3.4 refleja el resultado de 9 muestras de las 50 analizadas. En dicha figura se observa la presencia de todos los genotipos en estudio, con bandas amplificadas a 362, 450 y 905 pb, detectando los genotipos BRA-PER, CUB y REU respectivamente. Se detectó una incidencia del 100% del genotipo BRA-PER, seguido del genotipo REU con un 36% de incidencia y finalmente la detección del genotipo CUB fue en el 8% de las muestras analizadas.

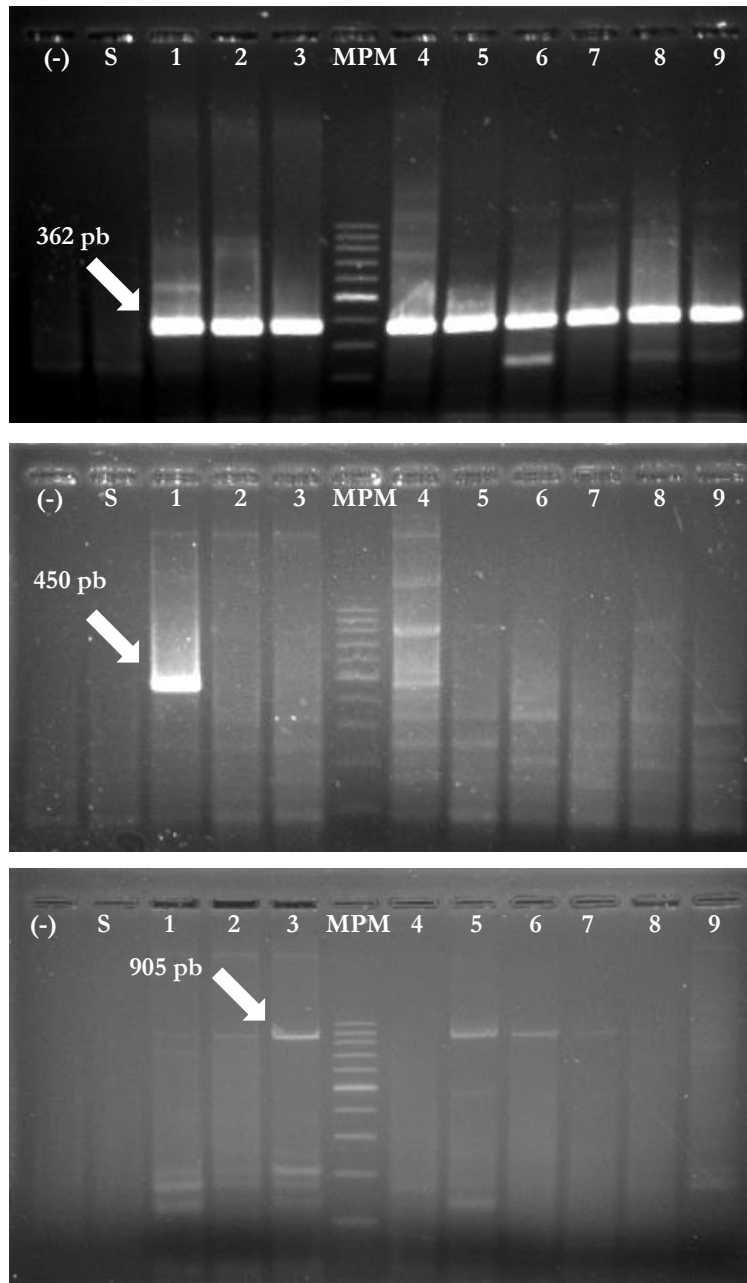


Figura 3 4. Geles agarosa 2% donde se exponen a modo de resumen 9 muestras de las 50 analizadas, con el objetivo de mostrar la amplificación de bandas a las 3 alturas deseadas. (-) negativo de la mix. S testigo negativo a SCYLV. MPM marcador de peso molecular de 100 a 1000 pb, banda fuerte a 500 pb. Calles 1 a 9, nueve muestras que resumen la detección de los tres genotipos dentro de las 50 muestras analizadas. 362 pb, altura de banda que detecta el genotipo BRA-PER. 450 pb, altura de banda que detecta el genotipo CUB. 905 pb, altura de banda que detecta el genotipo REU.

El 58% de las muestras estaban infectadas con el genotipo BRA-PER únicamente, pero patrones de co-infección de dos o tres genotipos también fueron encontrados: REU y BRA-PER se detectó en el 34%, CUB y BRA-PER en el 6% y los tres genotipos (BRA-PER, CUB y REU) en el 2% de las muestras. Los genotipos CUB y REU no se detectaron en forma aislada en ninguna muestra, ni combinados entre ellos sin la presencia de BRA-PER (Fig. 3.5).

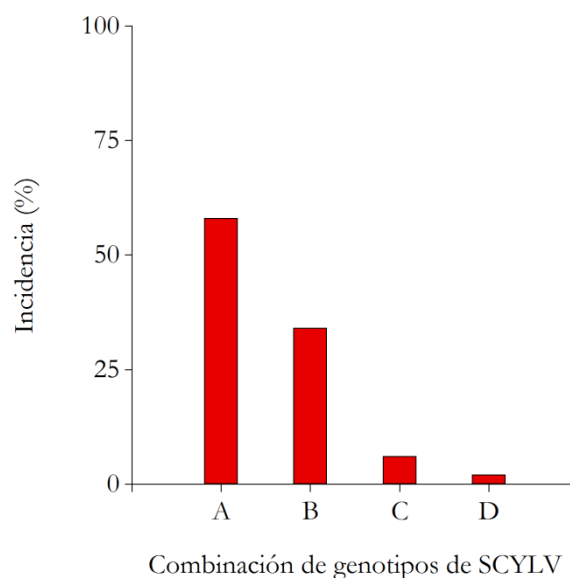


Figura 3 5. Porcentaje de incidencia de las distintas combinaciones de genotipos de SCYLV detectados en 50 muestras positivas al virus. **A.** genotipo BRA-PER. **B.** genotipos REU y BRA-PER. **C.** genotipos CUB y BRA-PER. **D.** genotipos CUB, REU y BRA-PER.

Tucumán fue la provincia que albergó en la variedad LCP 85-384 todas las combinaciones de genotipos virales detectadas (BRA-PER; BRA-PER+REU; BRA-PER+CUB y BRA-PER+CUB+REU) (Tabla 3.3), por el contrario en Ledesma se detectaron las combinaciones BRA-PER; BRA-PER+REU; BRA-PER+CUB. Finalmente solo dos combinaciones se detectaron en Orán (BRA-PER; BRA-PER+REU) debido a que el genotipo CUB no fue detectado en las muestras provenientes de este lugar (Fig. 3.1). Las 9 variedades analizadas presentaron un 100% de incidencia del genotipo BRA-PER. El genotipo CUB solo fue detectado en las variedades LCP 85-384 y NA 90-1001 (con un 10,5 y 20% de incidencia respectivamente). Finalmente el genotipo REU fue detectado en 7 de las 9 variedades analizadas.

Tabla 3 3. Detalle de las variedades analizadas para la detección de los genotipos BRA-PER, CUB y REU. La tabla especifica el número de muestras analizadas por variedad, y cuantas de ellas presenta cada genotipo en estudio. De cada variedad se detalla el porcentaje de cada genotipo detectado, tomando como 100% el número de muestras colectadas por variedad. Las dos últimas filas muestran el total de cada columna (sumatoria) y el porcentaje (tomando como 100% las 50 muestras analizadas).

| Variedades | n* | Genotipos SCYLV | | |
|-----------------------|-----|-----------------|------|------|
| | | BRA-PER | CUB | REU |
| LCP 85-384 | 19 | 19 | 2 | 10 |
| Porcentaje (%) | | 100 | 10,5 | 52,6 |
| NA 90-1001 | 10 | 10 | 2 | 2 |
| Porcentaje (%) | | 100 | 20 | 20 |
| NA 96-2929 | 9 | 9 | 0 | 2 |
| Porcentaje (%) | | 100 | 0 | 22,2 |
| CP 70-1133 | 4 | 4 | 0 | 1 |
| Porcentaje (%) | | 100 | 0 | 25 |
| NA 03-3300 | 2 | 2 | 0 | 1 |
| Porcentaje (%) | | 100 | 0 | 50 |
| RA 87-3 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Porcentaje (%) | | 100 | 0 | 0 |
| NA 97-3152 | 3 | 3 | 0 | 0 |
| Porcentaje (%) | | 100 | 0 | 0 |
| NA 05-860 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| Porcentaje (%) | | 100 | 0 | 100 |
| TUC 77-42 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| Porcentaje (%) | | 100 | 0 | 100 |
| Total | 50 | 50 | 4 | 18 |
| Porcentaje (%) | 100 | 100 | 8 | 36 |

*Muestras por variedad

Discusión

Los resultados obtenidos en la identificación de genotipos virales evidenciaron la presencia del genotipo BRA-PER en todas las muestras analizadas (incidencia del 100%). Este resultado concuerda con estudios realizados por Cafrune *et al.* (2012) y Bertani *et al.* (2014), quienes buscaron identificar distintos genotipos virales en muestras provenientes del NOA, encontrando solo positivas al genotipo BRA-PER. Abu Ahmad *et al.* (2006b) estudiaron la distribución geográfica de los genotipos virales BRA-PER, CUB y REU y concluyeron que los mismos no están uniformemente distribuidos en el mundo, siendo el genotipo BRA-PER el de mayor distribución hasta ese momento, debido a su detección en las 18 localidades muestreadas mientras que los genotipos CUB y REU se detectaron solo en 4 localidades cada uno. Debido a esta amplia distribución de BRA-PER, se cree que la enfermedad fue originariamente causada por este genotipo; para luego ser dispersado mundialmente a partir de material vegetal infectado, cuando aún no se conocía la etiología de la enfermedad y no era interceptada en las cuarentenas de caña de azúcar (Abu Ahmad *et al.*, 2006b). En nuestro país no hay citas de los genotipos CUB y REU, siendo los resultados de esta tesis los primeros en evidenciar la presencia de los mismos en el área de producción de caña de azúcar más importante de Argentina. La detección del genotipo CUB fue en el 8% de las muestras y la del genotipo REU en el 36%. Estos resultados aleatorios concuerdan con lo reportado por Abu Ahmad *et al.* (2006b) quienes afirman que los mismos también están mundialmente distribuidos pero que su incidencia depende en gran medida de las condiciones del área de producción. Los resultados obtenidos mostraron que el 58% de las muestras analizadas presentaban únicamente el genotipo BRA-PER. Pero que el resto de las muestras presentaron patrones de co-infección en distintas combinaciones. Detectando de esta manera, el 34% de las muestras con la combinación de los genotipos REU+BRA-PER, el 6% de las muestras con la combinación CUB+BRA-PER y el 2% de las muestras con la presencia de los tres genotipos simultáneamente (muestra perteneciente a la variedad LCP 85-384 proveniente de Tucumán). Los genotipos CUB y REU siempre se detectaron junto al genotipo BRA-PER. Estos patrones de co-infección fueron estudiados por Abu Ahmad *et al.* (2007b) quienes comprueban

que la capacidad de infección (transmisión y grado de infección) y virulencia (capacidad de causar síntomas en hoja) del genotipo BRA-PER (genotipo más virulento) en adición al genotipo REU posee mayor agresividad que la presencia de un solo genotipo viral. Estas conclusiones son especialmente importantes considerando que BRA-PER fue detectado en el 100% de las muestras y que se detectó por primera vez la combinación de los genotipos BRA-PER +REU en Argentina. Dentro de las variedades muestreadas, LCP 85-384 presentó una incidencia del 100% del genotipo BRA-PER, seguida de un 52,6 y 10,5% de incidencia, para los genotipos REU y CUB, respectivamente. A su vez, dicha variedad presentó todas las combinaciones detectadas (BRA-PER; BRA-PER+REU, BRA-PER+CUB y BRA-PER+CUB+REU). Una importante consideración a tener en cuenta es que LCP 85-384 es la variedad que ocupa casi el 80% de la superficie productora de caña de azúcar en Tucumán y que a su vez, el genotipo BRA-PER y su combinación con REU, son los más virulentos. Esto conlleva a la necesidad de tomar medidas de manejo que tiendan a disminuir la incidencia de los genotipos más virulentos en el área cañera, siendo una opción, la de reducir la superficie plantada con la variedad LCP 85-384. Las otras variedades muestreadas también presentaron un 100% de incidencia para el genotipo BRA-PER pero la incidencia de los genotipos CUB y REU fueron variables: solo la variedad NA 90-1001 presentó el genotipo CUB (con una incidencia del 20%) y el genotipo REU se detectó en 7 de las 9 variedades muestreadas con un 36% de incidencia, siendo RA 87-3 y NA 97-3152 las variedades que dieron negativas a REU mediante RT-PCR. La baja incidencia del genotipo CUB y la ausencia de antecedentes sobre su virulencia, hacen que no sea una preocupación al momento de la elección de las variedades a plantar. Por el contrario, un 36% de incidencia del genotipo REU, en co-infecciones con el genotipo BRA-PER es una alerta a los productores. En relación a las tres provincias muestreadas en el NOA, cabe destacar que los tres genotipos virales en estudio fueron detectados en Tucumán, distribuidos entre 7 departamentos muestreados, siendo esta provincia quien ocupa el 70% de la superficie con caña en el NOA. En el departamento Orán, provincia de Salta, los genotipos detectados fueron BRA-PER y BRA-PER junto a REU. En el departamento de Ledesma, provincia de Jujuy, los genotipos detectados fueron BRA-PER, y BRA-PER en co-infecciones con REU y CUB. Dicha variación de detección de los genotipos entre provincias, concuerdan con los resultados

arribados por Abu Ahmad *et al.* (2007a) quienes logran transmitir el genotipo REU a la variedad R570 proveniente de Guadalupe, no así a la misma variedad proveniente de Isla Reunión, esto llevó a concluir que REU varía en su patogenicidad según la distribución geográfica, resultado que posteriormente respaldan en su siguiente publicación (Abu Ahmad *et al.* 2007b).

Conclusiones del capítulo

- Se detectan por primera vez los genotipos virales CUB y REU en Argentina.
- Los genotipos virales BRA-PER, CUB y REU están ampliamente distribuidos en lotes comerciales de caña de azúcar del NOA.
- BRA-PER es el genotipo de mayor distribución en el NOA, encontrándolo solo o en combinación con los otros genotipos.
- Al ser la variedad LCP 85-384 de amplia distribución en la provincia de Tucumán y al presentar 100% de incidencia de BRA-PER siendo uno de los genotipos virales más patogénicos, se concluye que las medidas de manejo y control ante esta situación debieran ser prioritarias para técnicos cañeros y mejoradores.

Antecedentes

En la agroindustria azucarera, la caña de azúcar es la materia prima y su calidad es un factor determinante para la productividad de la actividad (Digonzelli *et al.*, 2015).

Diversas estrategias de manejo son llevadas a cabo para aumentar la productividad del cultivo, entre ellas, contar con una caña semilla de alta calidad es fundamental. Esto se define por sus características sanitarias (libres o con baja incidencia de plagas y enfermedades), identidad genética (responde a las características de la variedad) y características referidas al vigor (capacidad de brotación y crecimiento) (Romero *et al.*, 2009). En la industria, la materia prima de óptima calidad son aquellas cañas cosechadas que logran tener alta calidad a un bajo costo (Fig. 4.1) y se mide al finalizar el procesamiento industrial como la cantidad de azúcar que se recupera por tonelada de caña molida (rendimiento fabril) (Romero *et al.*, 2009).

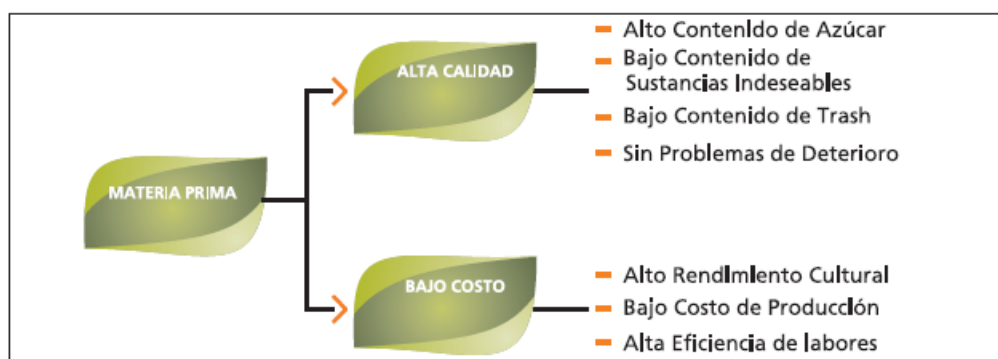


Figura 4 1. Características de la materia prima para ser de alta calidad y a un bajo costo. (Fuente: Romero *et al.*, 2009).

Los ingenios pueden realizar dos métodos de control sobre la materia prima para determinar el rendimiento y calidad. Uno de los métodos se denomina indirecto y consiste en analizar el jugo de primera presión. Este método es efectivo cuando el contenido de material no molible de origen vegetal o mineral (denominado materia extraña o trash) es bajo y los procesos de deterioro nulos. Las determinaciones que se realizan en el jugo son: el contenido de sólidos solubles

presentes en el jugo (brix %) mediante la lectura de un brixómetro (refractómetro); el contenido aparente de sacarosa en el jugo (pol % jugo) mediante polarímetros ópticos o digitales; determinación indirecta de pol % caña, mediante el valor de pol % jugo y un factor que estima el contenido de fibra de la caña (factor de Java); finalmente se calcula la pureza (%) como el porcentaje de sacarosa presente en los sólidos solubles (relación de brix y pol jugo). El otro método se denomina directo y se basa en tomar una muestra del transporte y analizarla previo a la molienda. De esta forma, se hace posible la obtención del valor de residuo sólido insoluble (fibra + trash) brindando más confiabilidad que el método indirecto. La muestra pasa por un desfibrador y posteriormente una submuestra pasa por una prensa hidráulica para obtener el jugo y por otro lado el residuo sólido insoluble. A la muestra de jugo se le realizan determinaciones para la obtención de valores de brix (%) y de pol jugo (%) (Digonzelli *et al.*, 2015).

En general las características principales de la caña de buena calidad dependen de factores relacionados con características agronómicas, aspectos morfológicos, calidad de jugos y condiciones agroclimáticas (Larrahondo, 1995). De esta forma, la calidad depende de características intrínsecas y extrínsecas, siendo la combinación de ambas lo que determina su potencial de producción de azúcar y energía. Para obtener una materia prima de calidad es necesario maximizar el contenido de azúcar y minimizar los aspectos que involucren pérdidas de dicho contenido. El contenido de azúcar puede aumentar con una correcta selección de variedades según el ambiente, planificar adecuadamente las labores, momento óptimo de cosecha, entre otros. Para minimizar los aspectos que disminuyen el contenido de azúcar, es necesario disminuir los niveles de materia extraña (trash), evitar la quema, mejorar la eficiencia de cosecha, disminuir el tiempo de estacionamiento, contar con un buen estado sanitario del cultivo, entre otros (Digonzelli *et al.*, 2015).

Considerando la selección de variedades en función del ambiente como uno de los aspectos fundamentales para lograr un incremento en el contenido de azúcar, cabe destacar la escasa distribución varietal que presenta la provincia de Tucumán, donde LCP 85-384 es la variedad comercial que mayor superficie cañera ocupa. En la campaña 2013/2014 esta variedad ocupó el 83% de la superficie cultivada con caña de azúcar en Tucumán. Posteriormente, en la campaña 2016/2017, se observó una reducción a 76,8% (Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes).

LCP 85-384 tiene la característica de ser de maduración temprana (cosecha desde mediados de junio), porte erecto, altura media de tallos y vainas con abundante pilosidad. En relación a las características fenológicas se observa una lenta energía de brotación, ritmo de crecimiento lento a intermedio, con abundante macollaje y a cosecha se observa alta población de tallos de diámetro delgado y livianos. LCP 85-384 es resistente al mosaico, escaldadura de hoja y estría roja; moderadamente resistente al carbón y muy susceptible a roya marrón; en Argentina no hay datos registrados de resistencia/tolerancia al virus del amarillamiento (Estación Experimental Agropecuaria Famaillá).

Otro de los aspectos a considerar para lograr un incremento en el contenido de azúcar radica en la planificación de las labores, considerando a la fertilización una de las prácticas agrícolas más importantes que se realiza, esta práctica influye directamente en la cantidad y calidad de caña producida, en el contenido de azúcar y de otros compuestos que afectan la recuperación de azúcar en los ingenios (Bolivar *et al.*, 2015). Dentro de los nutrientes más requeridos por la caña de azúcar se encuentra el nitrógeno, el cual estimula el crecimiento de las plantas aunque en exceso puede retardar la maduración y reducir la concentración de azúcares al provocar un intenso crecimiento de los tallos. Otro de los nutrientes requeridos por el cultivo es el potasio, responsable del transporte de los azúcares desde las hojas a los tallos, cuando el cultivo presenta déficit de potasio ocurre una disminución en el contenido de sacarosa y un incremento de azúcares reductores y ante un exceso del mismo se evidencian cambios en la cristalización de la sacarosa pudiendo provocar incrustaciones. Por último, el fósforo es esencial para la síntesis de clorofila y participa en la formación de sacarosa y otros azúcares (Bolivar *et al.*, 2015).

El momento óptimo de cosecha es otro factor indispensable a tener en cuenta para maximizar el contenido de azúcar, el objetivo es recolectar la materia prima disponible en el campo con mínimas pérdidas y alta eficiencia. Dicho momento ocurre en la fase fenológica denominada maduración y en ella se determina el contenido final de sacarosa en los tallos y la producción de azúcar por unidad de área. Es muy importante realizar la cosecha del cultivo cuando los tallos presentan la madurez óptima, de esta forma la composición química de los mismos comprenderá valores altos de contenido de sacarosa en el jugo (Fig. 4.2). Cuando el cultivo llega a su madurez, hay una disminución progresiva del ritmo de elongación caulinar y mantenimiento temporal de un área foliar fotosintéticamente activa. Si

bien factores como el agua, nutrientes, radiación solar y bajas temperaturas inciden directamente sobre el ritmo de envejecimiento, las variedades de caña utilizadas son un factor intrínseco de gran importancia en la maduración (Romero *et al.*, 2009).

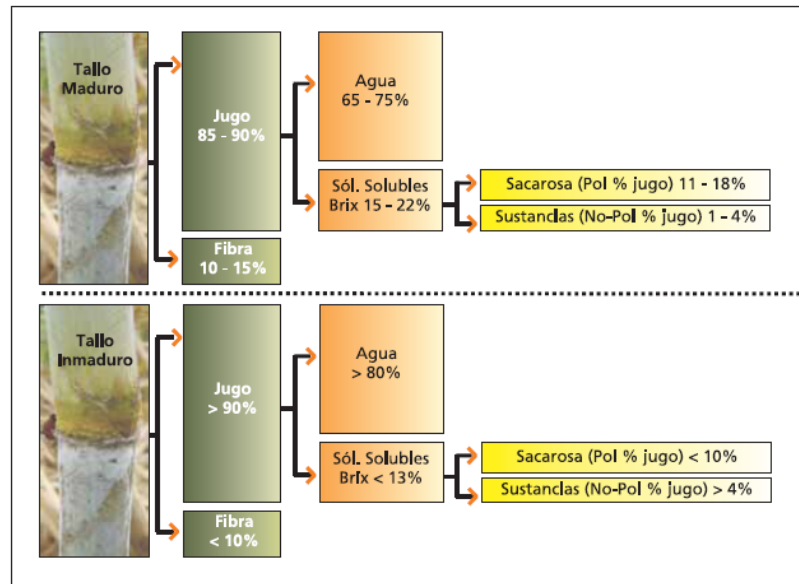


Figura 4 2. Comparación de la composición química entre tallos maduros e inmaduros al momento de la molienda (Fuente: Romero *et al.*, 2009).

En relación al estado sanitario del cultivo, es muy importante tener identificadas y caracterizadas las plagas y enfermedades que lo afectan y el tipo de daño que generan en la planta, de esta forma se podrá inferir si hay una afectación en el peso de la caña y/o en la calidad de los jugos a causa de su presencia (Bolívar *et al.*, 2015). En Argentina, el cultivo de la caña de azúcar está afectado por diversas plagas, siendo las principales: el gusano perforador del brote (*Elasmopalpus lignosellus*) y el gusano perforador de la caña de azúcar (*Diatraea saccharalis*) los cuales producen galerías en los tallos (daño directo) favoreciendo la entrada de microorganismos como *Fusarium* y *Colletotrichum* que causan pudrición roja de la caña (daño indirecto) disminuyendo la pureza y el rendimiento de azúcar (Bolívar *et al.*, 2015). La oruga militar verdadera (*Pseudaletia unipuncta*) y el gusano cuarteador (*Mocis latipes*) los cuales producen defoliación de brotes jóvenes y retrasan el crecimiento del cultivo. Finalmente, el picudo perforador de la caña de azúcar (*Acrotomopus atropunctellus*) produce daños en estado de larva y adulto al alimentarse del interior de los tallos acortando su longevidad y retrasando el crecimiento, estos daños se reflejan en un menor peso y altura de los tallos (Digonzelli *et al.*, 2015). Las enfermedades presentes en el cultivo de la caña de

azúcar (producidas por virus, hongos y bacterias) también afectan la calidad de los jugos y la recuperación de azúcares debido al incremento de azúcares reductores, la acumulación de gomas y flavonoides, entre otros (Bolivar *et al.*, 2015). En Argentina, las principales enfermedades fúngicas que afectan al cultivo son la roya marrón (*Puccinia melanocephala*) (Fig. 4.3A) y la roya naranja (*Puccinia kuehnii*) (Fig. 4.3B) causando disminución del área fotosintética, deformación, manchado, marchitamiento y hasta la muerte de la planta en infecciones severas; y el carbón de la caña de azúcar (*Ustilago scitaminea*) causando el característico síntoma de látigo en la parte terminal de los tallos afectados (Fig. 4.3C), esto produce la detención del crecimiento y posterior muerte de la planta. Dentro de las enfermedades causadas por bacterias se encuentra el raquitismo de las cañas socas (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) donde el daño se traduce en un retraso del crecimiento, disminución del número de tallos y plantas con apariencia raquílica (Fig. 4.3D); la escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans*) (Fig. 4.3E) que puede llegar a provocar en una fase aguda la muerte súbita de las plantas sin síntomas crónicos. Por último, la estría roja (*Acidovorax avenae*) provoca estrías rojas en las hojas (Fig. 4.3F), podredumbre del tallo y en casos severos la muerte de la planta. Finalmente dentro de las enfermedades virales detectadas en Argentina se encuentra la enfermedad del mosaico de la caña de azúcar (*Sugarcane mosaic virus* y *Sorghum mosaic virus*) la cual produce decoloraciones en hojas de variedades susceptibles (Fig. 4.3G) provocando un retraso del crecimiento lo que se traduce en plantas de menor altura y la enfermedad del amarillamiento (*Sugarcane yellow leaf virus*) asociada al cambio de color de la nervadura central que se torna de color amarillo intenso cuando la lámina aún está verde (Fig. 4.3H) y en algunas ocasiones la hoja se necrosa comenzando desde la punta hacia la base (Digonzelli *et al.*, 2015).

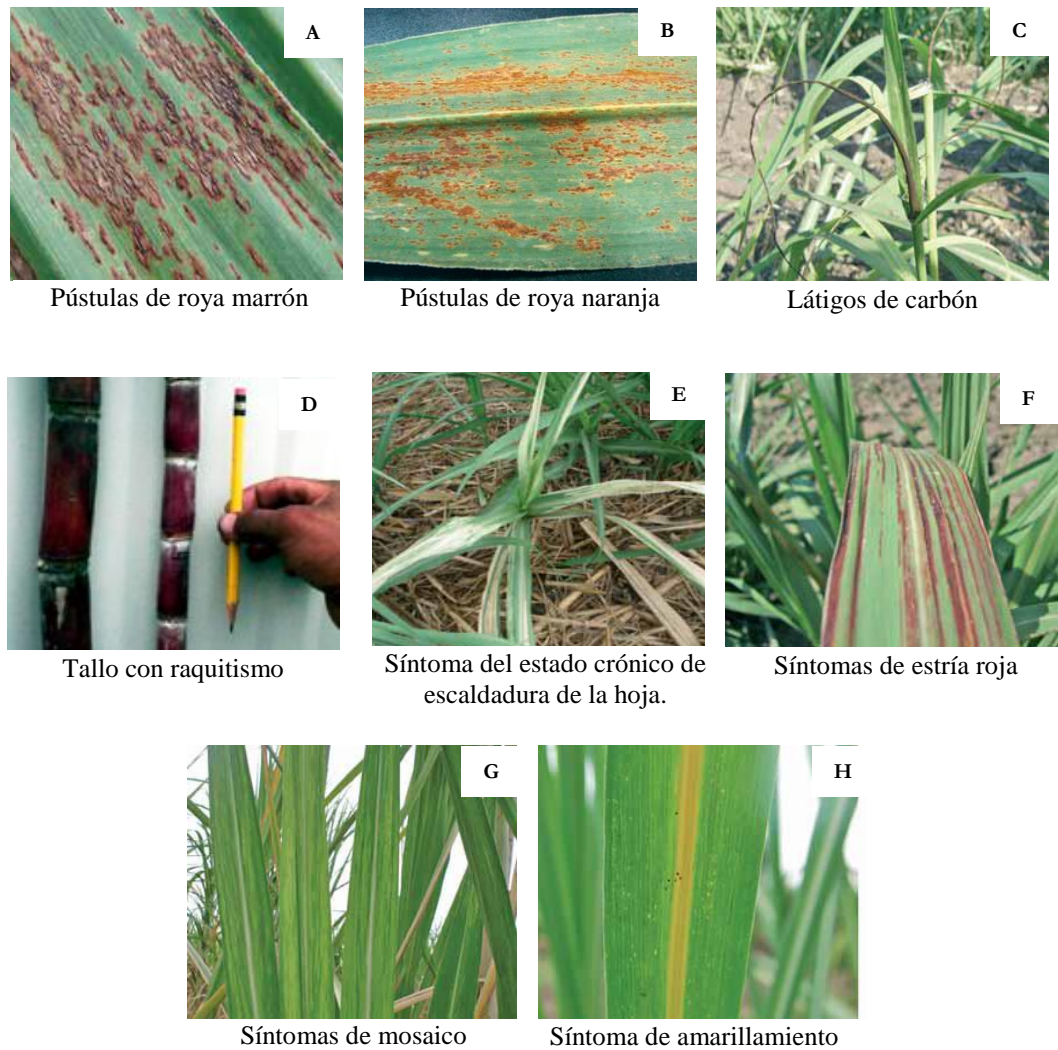


Figura 4 3. Fotos de síntomas característicos de las principales enfermedades fúngicas, bacterianas y virales del cultivo de caña de azúcar en Argentina. (Fotos A, B, C, E, F, G y H tomadas de Romero *et al.*, 2009; foto D tomada de cincae.org).

Esta última, la enfermedad del amarillamiento foliar, cuyo agente causal detectado en Argentina es *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV), es una de las enfermedades más estudiadas en las últimas décadas. Diversas investigaciones enuncian una disminución en el rendimiento a causa de esta enfermedad, siendo las primeras pérdidas detectadas en Brasil en la variedad SP71-6163 con un 25% de disminución en el rendimiento sacarino (Vega *et al.*, 1997). Posteriormente, Grisham *et al.* (2001) realizaron experimentos en Louisiana para comparar rendimiento y calidad de jugos entre cañaverales infectados con SCYLV y no infectados, obteniendo como resultado una disminución en el número de tallos y toneladas obtenidas en lotes infectados con SCYLV; a su vez, los porcentajes de °Brix, sacarosa y pureza fueron mayores en el jugo de hojas infectadas comparado

con el tejido de hojas sanas. Rassaby *et al.* (2003) analizaron el impacto de SCYLV en el rendimiento y calidad de jugos en las tres variedades que ocupan más del 90% de la superficie con caña de azúcar en Isla Reunión (R570, R577 y R579) detectando en el primer ciclo del cultivo una disminución en el rendimiento de plantas infectadas con SCYLV pertenecientes a las variedades R577 (37%) y R579 (19%) no así en la variedad R570. Por lo que estos autores concluyen que el impacto de SCYLV y la tolerancia de la caña de azúcar al virus varían en función a la variedad empleada. Zhu *et al.* (2010) al estudiar la correlación entre el título de SCYLV y los síntomas de la enfermedad con el rendimiento sacarino y de biomasa, detectan una reducción en la biomasa (60%) y sacarosa (54%) en lotes sintomáticos con respecto a los lotes sin síntoma. La explicación a estas disminuciones en el rendimiento sacarino radica en que los miembros de la familia Luteoviridae están confinados al tejido floemático de sus hospedantes, principalmente en los tubos cribosos y en las células acompañantes (Francki *et al.*, 1985). El descenso y la distribución fuente-destino de los azúcares (principalmente sacarosa) requiere el pasaje por estas células, las cuales están modificadas durante el movimiento del virus a través del floema restringiendo dicho movimiento (Lalonde *et al.*, 2003). Estudios fisiológicos realizados en la variedad H87-4094 mostraron que las hojas de plantas infectadas con SCYLV exhibían un alto contenido de carbohidratos (almidón) con un bajo nivel de clorofila y una menor capacidad fotosintética en comparación a las no infectadas, esto indica que el transporte de asimilados en plantas infectadas con el virus es reducido en comparación a las plantas libres de SCYLV (Lehrer *et al.*, 2001); los autores respaldan los resultados obtenidos con la hipótesis de que la proteína de movimiento del virus modifica los plasmodesmos y reduce la velocidad de translocación de asimilados; esto provoca que la sacarosa producida en la fotosíntesis no pueda ser exportada a tasas normales, por lo que se acumula en las hojas causando un incremento en la deposición de almidón, permitiendo alteraciones en el aparato fotosintético tales como aumento de la degradación de clorofila y reducción en la capacidad fotosintética (Lehrer *et al.*, 2001). Similares resultados fueron obtenidos por Bertani *et al.* (2014) quienes observaron al microscopio óptico altos niveles de almidón en células de la vaina pertenecientes a plantas SCYLV positivas, en comparación a las muestras provenientes de plantas libres del virus. Pese a esta hipótesis sobre la disminución del rendimiento sacarino en plantas positivas a SCYLV, diversos autores

presentaron resultados opuestos, tales como los publicados por Grisham *et al.* (2009) quienes analizan el efecto de SCYLV sobre el rendimiento sacarino de cuatro variedades comerciales que mayor superficie ocupan en Louisiana, entre ellas LCP 85-384, donde esta variedad no presentó disminuciones en el rendimiento sacarino y tampoco en el rendimiento de caña durante el primer año de observación; por el contrario, durante el segundo año, presentó disminuciones en el rendimiento de caña pero no en el rendimiento sacarino total, al presentar un aumento en el rendimiento recuperable teórico de sacarosa (TRS). Por otra parte, Vasconcelos *et al.* (2007) encuentran una reducción significativa del peso seco de la raíz y el peso fresco de la parte aérea de plantas positivas a SCYLV y un aumento del porcentaje de °brix y sacarosa en los tallos; según estos autores, esto ocurre debido a que un sistema radicular reducido y/o dañado interrumpe el transporte de azúcares desde la fuente (hojas) hacia el destino (raíces) provocando la acumulación de los mismos en los tallos. Finalmente, Khoodoo *et al.* (2010) publican resultados similares al detectar un mayor contenido de sacarosa en tallos infectados que en tallos negativos al virus mediante TBIA.

Si bien hay citas que indican que SCYLV causa mermas de rendimiento en cañaverales del mundo, en Argentina no hay antecedentes que lo demuestren, ya que luego de su primera detección por sintomatología en el año 1997 (Ramallo y Ploper, 1998) y de la identificación del agente causal en el año 2002 (Moonan y Mirkov, 2002) solo se ha realizado en el país la identificación de distintas razas virales y estudios preliminares sobre su distribución (Bertani *et al.*, 2014; Cafrune *et al.*, 2012).

Objetivo

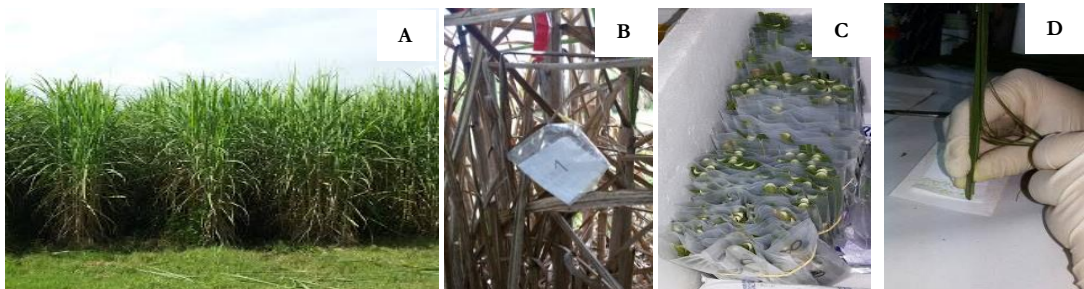
Establecer el efecto del amarillamiento sobre el rendimiento sacarino y su impacto económico.

Materiales y Métodos

▪ Material vegetal

Para evaluar el efecto de SCYLV en plantas de caña de azúcar se llevó a cabo un ensayo en tres zonas de producción diferentes: Ingenio Ledesma, Ingenio San Martín del Tabacal y EEA INTA-Famaillá. En cada lugar, se seleccionó un lote comercial de la variedad LCP 85-384, donde se marcaron 200 plantas distribuidas de la siguiente manera: 25 plantas por línea a un metro de distancia entre plantas y 8 líneas surco de por medio. De cada planta marcada, se tomó una muestra de hoja (+1), para su posterior análisis en el laboratorio de virología (IPAVE-INTA). Para la detección de SCYLV, se imprimieron las nervaduras centrales de las 200 muestras de cada lote en membranas de nitrocelulosa, con el objetivo de adsorber el antígeno viral a la membrana. Las muestras vegetales se conservaron a -40°C y las membranas de nitrocelulosa a temperatura ambiente. (Fig. 4.4).

Figura 4 4. Detalle del proceso de toma de muestras a campo. **A.** lote comercial de la variedad LCP 85-384 ubicado en EEA INTA-Famaillá. **B.** etiqueta en la planta donde se tomó la muestra número 1. **C.** 200 muestras empaquetadas y refrigeradas para su traslado a Córdoba. **D.** impresión de la nervadura central de una hoja de caña de azúcar en membrana de nitrocelulosa.



- Detección de SCYLV

Las membranas de nitrocelulosa con las 600 impresiones de nervadura central, fueron reveladas siguiendo el protocolo de Schenck *et al.* (1997) para la detección del virus del amarillamiento, descrito en la sección de materiales y métodos del capítulo II. Se consideraron positivas, aquellas muestras que presentaron al menos un haz vascular con coloración violeta.

- Cosecha del material vegetal marcado y medición de parámetros del rendimiento sacarino

Los resultados obtenidos mediante TBIA sirvieron para armar dos grupos de plantas: un grupo de positivas a SCYLV y un grupo de negativas a SCYLV. Con esta información y cuando los lotes comerciales llegaron a la fase fenológica de maduración, ambos grupos se cosecharon por separado. La cosecha consistió en cortar las cañas marcadas, eliminarle las hojas y despuntarlas. Las cañas cosechadas se agruparon de a 5 tallos, se pesaron y luego fueron ingresadas al trapiche experimental ubicado en cada lugar. Los parámetros de rendimiento sacarino medidos fueron: grados brix ($^{\circ}$ Brix), que representa el contenido de sólidos solubles totales del jugo y la lectura polarimétrica, que mide la rotación óptica que se produce sobre un haz de luz polarizada al pasar por el contenido de sacarosa presente en el jugo de caña (Fig. 4.5). A partir de dichos parámetros medidos en laboratorio, se calcularon los siguientes parámetros de rendimiento: Pol jugo, que representó el contenido aparente de sacarosa en la muestra de jugo. Pol caña, que se calculó indirectamente, utilizando pol jugo y el Factor de Java (0,81). Pureza, la cual conceptualmente expresó el porcentaje de sacarosa en los sólidos solubles del jugo y el rendimiento fabril teórico, utilizando para su cálculo los valores de pureza y pol jugo.

Dichos parámetros se obtuvieron de la siguiente manera:

$^{\circ}$ Brix= a partir de la lectura de un refractómetro automático.

Pol jugo = (lectura polarimétrica * 26)/ (99,7*(1+0,004*brix))

Pol caña = Pol jugo * 0,81

Pureza = (pol jugo / $^{\circ}$ brix)*100

Rendimiento fabril teórico = (1,4-40/pureza)*pol jugo *0,657



Figura 4 5. Detalle del proceso de cosecha. **A.** corte, despunte y deshojado de las cañas marcadas a campo. **B.** atados de 5 cañas separadas en dos grupos según presencia/ausencia SCYLV. **C.** jugo de caña en dos preparaciones diferentes para su posterior análisis. **D.** polarímetro con muestras de jugo de caña por detrás. **E.** refractómetro, con una muestra de jugo de caña.

- **Análisis de datos**

Los resultados obtenidos se evaluaron mediante medidas resumen, ANAVA y prueba T para muestras independientes mediante el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2017).

- **Impacto económico**

Para obtener resultados comparables, se llevó la escala del ensayo a una hectárea. Con datos de una densidad teórica de 15-30 yemas en un metro lineal de surco, un porcentaje de emergencia del 60%, surcos con base de 0,5 metros, una distancia entre surcos de 1,5 metros y 60 surcos por hectárea; se obtuvo un valor de población de 158.400 plantas de cañas en una hectárea. De los resultados obtenidos en el trapiche experimental de EEA INTA-Famaillá y el Ingenio Ledesma se obtuvo para cada condición sanitaria el número de atados de 5 cañas cada uno, el número total de cañas analizadas, el peso promedio de esas cañas y la relación de sacarosa promedio (interpretada como las toneladas de caña necesarias para extraer una tonelada de azúcar). Las toneladas de caña producidas en una hectárea se estimó en función del peso promedio del N° de cada ensayo (65 cañas en Famaillá y 35 cañas en Ledesma) y el valor teórico calculado de 158.400 cañas/ha. Posteriormente se realizaron las estimaciones correspondientes a la producción de azúcar (t/ha) en función de las toneladas de caña/ha y la relación sacarosa promedio, obteniendo diferentes valores para cada condición sanitaria y cada procedencia del material. En función a estos resultados se calculó la merma en las toneladas de azúcar producidas en una hectárea de plantas de caña SCYLV+ en

relación a una hectárea de cañas SCYLV-. Asumiendo un valor teórico y estimativo del precio de la tonelada de azúcar, se asignó un valor monetario a la pérdida de toneladas de azúcar por hectárea a causa de la presencia de SCYLV en el campo.

Resultados

La detección de SCYLV en los 3 lotes comerciales de LCP 85-384 ubicados en el Ingenio Ledesma, Ingenio Tabacal y EEA INTA-Famaillá analizados mediante TBIA dieron como resultado una incidencia del virus del 18% (36/200) en el ingenio Ledesma, 32% (64/200) en EEA INTA-Famaillá (Fig. 4.6) y no fue detectado en ninguna de las 200 plantas marcadas y analizadas en el Ingenio Tabacal (0/200). A partir de dichos resultados, se decide descartar el ensayo proveniente de Tabacal, debido a que la ausencia de positivas no nos permitiría estimar disminuciones en el rendimiento sacarino a causa de la enfermedad.

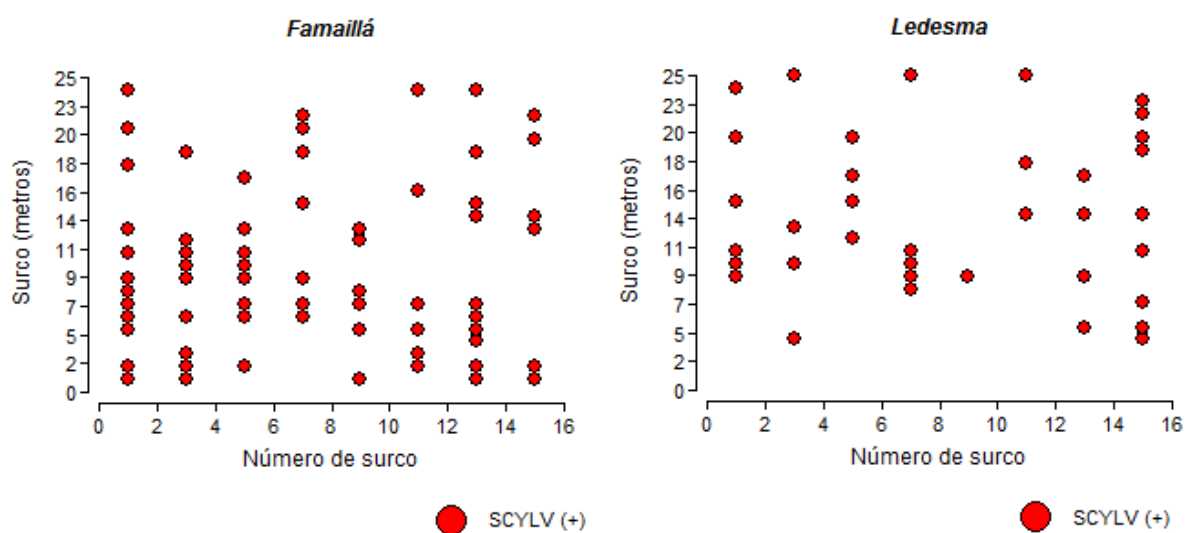


Figura 4 6. Presencia de SCYLV en lotes comerciales de LCP 85-384. Izquierda: EEA INTA-Famaillá. Derecha: Ingenio Ledesma. Muestras positivas a SCYLV en color rojo.

Una vez identificada la sanidad de las plantas marcadas a campo, se armaron dos grupos según presencia/ausencia de SCYLV y dentro de cada grupo se armaron atados de 5 cañas (en función de la capacidad operativa del trapiche experimental de cada zona). De esta forma, los grupos pertenecientes a EEA INTA-Famaillá estuvieron conformados por 64 cañas positivas a SCYLV y 136 cañas negativas a SCYLV. En tanto que en el ingenio Ledesma, el grupo de positivas a SCYLV fue de 36 cañas y el de negativas de 164 cañas. La cantidad de atados a pasar por el trapiche quedaron determinados de la siguiente manera: 13 atados de

positivas a SCYLV y 13 atados de negativas, en el ensayo de Famaillá y en el ensayo de Ledesma quedaron 7 atados de positivas a SCYLV y 7 atados negativas.

Las negativas, tanto de Famaillá como de Ledesma, fueron mucho más que las positivas, pese a esto, se decidió trabajar con igual número de atados en cada grupo, para homogeneizar los resultados, por tal motivo el procedimiento empleado consistió en seleccionar al azar 13 atados para Famaillá y 7 atados para Ledesma. Las mediciones obtenidas de cada uno de los atados para cada grupo de sanidad se muestran en la tabla 4.1 y 4.2.

Tabla 4 1. Valores de rendimiento sacarino (%) según presencia/ausencia de SCYLV en la variedad LCP 85-384 proveniente del ensayo ubicado en EEA INTA-Famaillá. Para cada atado se detalla peso, lecturas del refractómetro y polarímetro y los valores calculados de Pol jugo, Pol caña y Pureza.

| Sanidad | Nº atado | Peso (kg) | Lectura refractómetro | Lectura polarímetro | Pol jugo | Pol caña | Pureza | Rendimiento (%) |
|---------|----------|-----------|-----------------------|---------------------|----------|----------|--------|-----------------|
| SCYLV+ | 1 | 4 | 19,04 | 70,6 | 17,11 | 13,86 | 86,24 | 10,52 |
| | 2 | 4 | 19,12 | 72,2 | 17,49 | 14,16 | 87,80 | 10,85 |
| | 3 | 3 | 18,74 | 69,9 | 16,95 | 13,73 | 86,85 | 10,46 |
| | 4 | 3 | 18,90 | 72,0 | 17,45 | 14,14 | 88,65 | 10,88 |
| | 5 | 4 | 18,78 | 70,1 | 17,00 | 13,77 | 86,90 | 10,50 |
| | 6 | 3 | 18,99 | 71,7 | 17,37 | 14,07 | 87,84 | 10,78 |
| | 7 | 3 | 19,23 | 72,5 | 17,55 | 14,22 | 87,63 | 10,88 |
| | 8 | 4 | 18,78 | 69,1 | 16,76 | 13,57 | 85,66 | 10,27 |
| | 9 | 3 | 18,59 | 68,4 | 16,60 | 13,45 | 85,72 | 10,18 |
| | 10 | 3 | 18,63 | 68,8 | 16,69 | 13,52 | 86,03 | 10,26 |
| | 11 | 3 | 18,69 | 68,4 | 16,59 | 13,44 | 85,23 | 10,15 |
| | 12 | 4 | 19,51 | 73,4 | 17,75 | 14,38 | 87,35 | 10,99 |
| | 13 | 3 | 18,29 | 67,3 | 16,35 | 13,24 | 85,82 | 10,03 |
| SCYLV - | 1 | 4 | 20,04 | 77,0 | 18,59 | 15,06 | 89,04 | 11,61 |
| | 2 | 4 | 19,84 | 76,0 | 18,36 | 14,87 | 88,83 | 11,46 |
| | 3 | 4 | 19,99 | 76,3 | 18,42 | 14,92 | 88,47 | 11,47 |
| | 4 | 3 | 19,74 | 74,8 | 18,08 | 14,64 | 87,91 | 11,22 |
| | 5 | 3 | 20,08 | 76,6 | 18,49 | 14,97 | 88,39 | 11,51 |
| | 6 | 3 | 19,30 | 72,1 | 17,45 | 14,14 | 86,81 | 10,77 |
| | 7 | 3 | 19,61 | 74,7 | 18,06 | 14,63 | 88,41 | 11,24 |
| | 8 | 4 | 20,32 | 77,1 | 18,59 | 15,06 | 87,83 | 11,54 |
| | 9 | 5 | 20,29 | 78,3 | 18,88 | 15,30 | 89,34 | 11,81 |
| | 10 | 4 | 19,68 | 75,0 | 18,13 | 14,68 | 88,43 | 11,29 |
| | 11 | 3 | 19,69 | 74,6 | 18,03 | 14,60 | 87,91 | 11,19 |
| | 12 | 3 | 19,93 | 73,3 | 17,70 | 14,34 | 85,26 | 10,83 |
| | 13 | 3 | 19,77 | 73,1 | 17,66 | 14,31 | 85,77 | 10,83 |

Tabla 4 2. Valores de rendimiento sacarino (%) según presencia/ausencia de SCYLV en la variedad LCP 85-384 proveniente del ensayo ubicado en el Ingenio Ledesma. Para cada atado se detalla peso, lecturas del refractómetro y polarímetro y los valores calculados de Pol jugo, Pol caña y Pureza.

| Sanidad | N° atado | Peso (kg) | Lectura refractómetro | Lectura polarímetro | Pol jugo | Pol caña | Pureza | Rendimiento (%) |
|---------|----------|-----------|-----------------------|---------------------|----------|----------|--------|-----------------|
| SCYLV+ | 1 | 4 | 17,88 | 64,0 | 15,52 | 13,02 | 86,80 | 11,18 |
| | 2 | 3 | 18,68 | 67,7 | 16,36 | 13,72 | 87,58 | 11,83 |
| | 3 | 3 | 17,88 | 64,3 | 15,59 | 13,06 | 87,21 | 11,23 |
| | 4 | 3 | 17,69 | 62,6 | 15,19 | 12,89 | 85,88 | 11,05 |
| | 5 | 3 | 19,07 | 69,6 | 16,80 | 13,97 | 88,11 | 12,05 |
| | 6 | 4 | 18,10 | 65,2 | 15,8 | 13,39 | 87,31 | 11,57 |
| | 7 | 3 | 18,57 | 66,9 | 16,18 | 13,47 | 87,11 | 11,55 |
| SCYLV - | 1 | 3 | 18,39 | 65,9 | 15,96 | 13,50 | 86,77 | 11,62 |
| | 2 | 3 | 18,54 | 66,3 | 16,04 | 13,31 | 86,54 | 11,36 |
| | 3 | 3 | 18,15 | 65,3 | 15,83 | 13,36 | 87,21 | 11,52 |
| | 4 | 3 | 18,66 | 67,8 | 16,4 | 13,92 | 87,87 | 12,07 |
| | 5 | 3 | 18,38 | 66,0 | 15,98 | 13,84 | 86,92 | 12,02 |
| | 6 | 9 | 19,41 | 70,7 | 17,06 | 14,53 | 87,87 | 12,62 |
| | 7 | 3 | 18,96 | 69,3 | 16,73 | 14,10 | 88,22 | 12,22 |

Las medias de las lecturas del refractómetro (°Brix) y polarímetro fueron mayores en el grupo de cañas negativas a SCYLV que en el de positivas, tanto en Famaillá como en Ledesma y a su vez los valores obtenidos en Famaillá fueron mayores que en Ledesma, tanto para las negativas como para las positivas (Fig. 4.7).

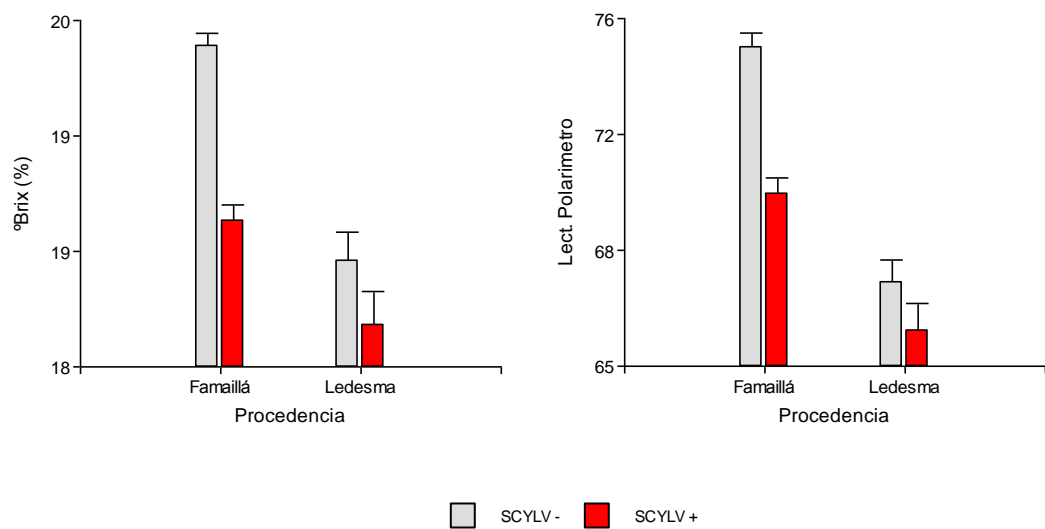


Figura 4 7. Comparación de las mediciones de °Brix (izquierda) y lectura polarimétrica (derecha) en relación a la procedencia de las muestras (Famaillá y Ledesma) y su sanidad (SCYLV negativas y SCYLV positivas).

La comparación de medias (esperanzas) en dos poblaciones diferentes (distribuciones) se realizó mediante la ejecución de la prueba T para muestras independientes de InfoStat. Tomando a la condición sanitaria como criterio de clasificación (grupos negativos y positivos a SCYLV) y particionando el análisis según la procedencia (EEA INTA-Famaillá e Ingenio Ledesma) se observó que los valores medios pertenecientes a las 6 variables en estudio fueron mayores en los grupos de cañas negativas a SCYLV en comparación con los grupos positivos al virus. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas en el ensayo de EEA INTA-Famaillá ($P < 0,05$), no así en el Ingenio Ledesma ($P > 0,05$) (tabla 4.3 y Fig. 4.8).

Tabla 4 3. Prueba T para muestras independientes de InfoStat. Comparación de medias según la sanidad de las muestras (SCYLV negativas y SCYLV positivas) en dos poblaciones diferentes según la procedencia (Famaillá y Ledesma). Las variables en estudio fueron: Brix, lectura polarimétrica, pol jugo, pol caña, pureza y rendimiento sacarino.

| Procedencia | Variable | Media grupo SCYLV - | Media grupo SCYLV + | Diferencia entre medias | P-valor |
|--------------------|-------------------|---------------------|---------------------|-------------------------|---------|
| EEA INTA-Famaillá* | Brix (%) | 19,87 | 18,87 | 1,00 | <0,0001 |
| | Lect. Polar. | 75,30 | 70,34 | 4,96 | <0,0001 |
| | Pol (%) jugo | 18,19 | 17,05 | 1,14 | <0,0001 |
| | Pol (%) caña | 14,73 | 13,81 | 0,92 | <0,0001 |
| | Pureza (%) | 87,88 | 86,75 | 1,13 | 0,0188 |
| | Rto. sacarino (%) | 11,29 | 10,52 | 0,77 | <0,0001 |
| Ingenio Ledesma ** | Brix (%) | 18,64 | 18,27 | 0,37 | 0,1615 |
| | Lect. Polar. | 67,33 | 65,73 | 1,60 | 0,2050 |
| | Pol (%) jugo | 16,29 | 15,92 | 0,37 | 0,2051 |
| | Pol (%) caña | 13,79 | 13,36 | 0,43 | 0,0762 |
| | Pureza (%) | 87,34 | 87,14 | 0,20 | 0,5861 |
| | Rto. sacarino (%) | 11,92 | 11,49 | 0,42 | 0,0739 |

* n = 13 (para cada condición sanitaria).

** n = 7 (para cada condición sanitaria).

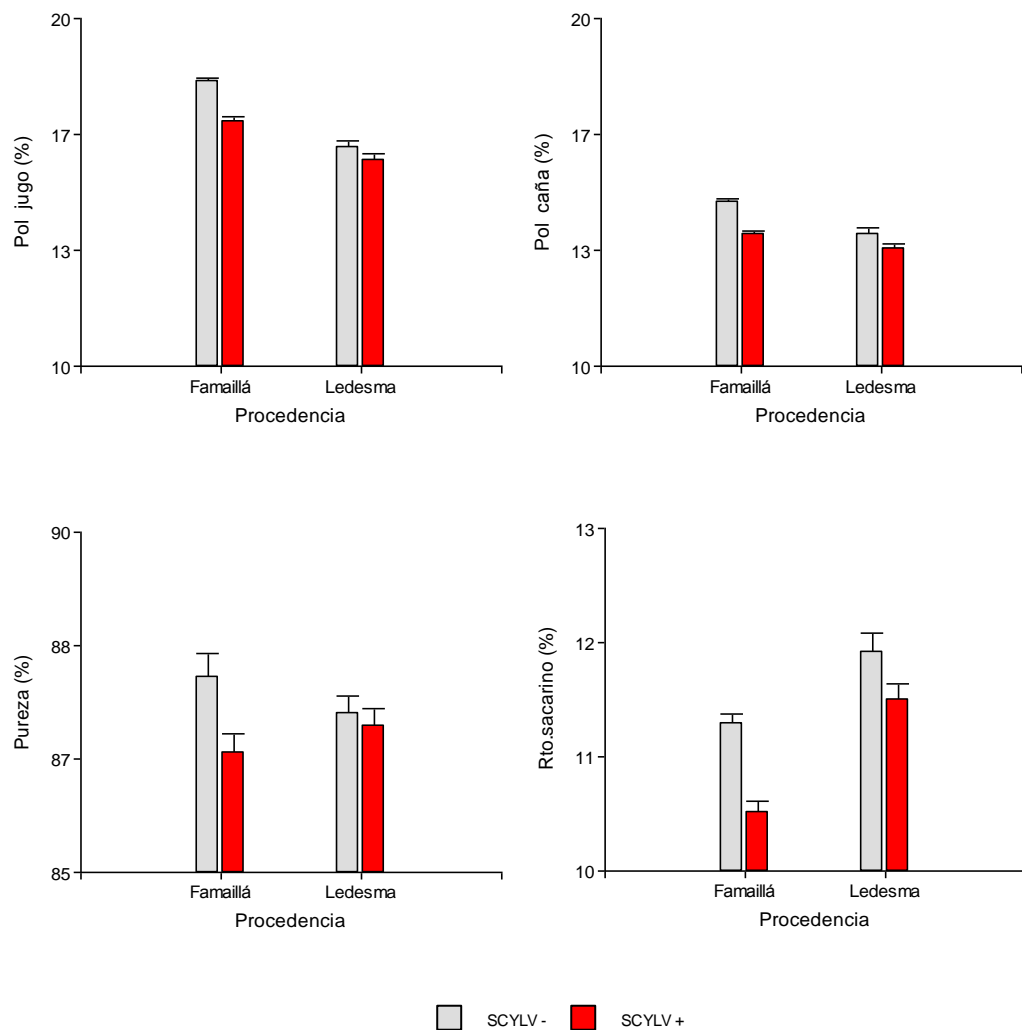


Figura 4 8. Resultados obtenidos para pol jugo, pol caña, pureza y rendimiento sacarino en relación a la procedencia de las muestras (Famaillá y Ledesma) y su sanidad (SCYLV negativas y SCYLV positivas).

Los resultados obtenidos a partir del cálculo del impacto económico de SCYLV en el cultivo de caña de azúcar, arrojaron mermas de 0,17 t azúcar/ha en Famaillá y de 1,20 t azúcar/ha en Ledesma, lo que implicarían (a 9.000\$/t de azúcar) una pérdida de 1.514\$ por hectárea en Famaillá y 10.804 \$ por hectárea en Ledesma, eso significa una disminución de 1,64% y 11,69% en los ensayos de Famaillá y Ledesma, respectivamente (tab. 4.4).

Tabla 4 4. Cálculo de \$ perdidos/ha ante la merma de t azúcar/ha producidas en muestras SCYLV+ en comparación a las muestras SCYLV- en los ensayos llevados a cabo en EEA INTA-Famaillá y en el Ingenio Ledesma.

| Procedencia | Sanidad | Nº atados | Nº cañas | Relación sacarosa promedio | Peso prom (kg) | t/ha * | t azúcar/ha (t) ** | Merma azúcar/ha (t) *** | \$/t ***** | perdida/ha (\$) | perdida/ha (%) |
|-------------------|---------|-----------|----------|----------------------------|----------------|--------|--------------------|-------------------------|------------|-----------------|----------------|
| EEA INTA-Famaillá | SCYLV+ | 13 | 65 | 10,52 | 44 | 107,2 | 10,19 | 0,17 | 9.000 | 1.514 | 1,64 |
| | SCYLV - | 13 | 65 | 11,29 | 48 | 117,0 | 10,36 | | | | |
| Ingenio Ledesma | SCYLV+ | 7 | 35 | 11,49 | 23 | 104,1 | 9,06 | 1,20 | | 10.804 | 11,69 |
| | SCYLV - | 7 | 35 | 11,91 | 27 | 122,2 | 10,26 | | | | |

*Se tomó como valor teórico estimado 158.400 cañas/ha

**Producción azúcar (t/ha)=producción caña (t/ha)/ relacion sacarosa prom

***Diferencia entre t azúcar/ha producidas por las cañas SCYLV+ y SCYLV-

****Valor teórico estimado

Discusión

Los ensayos realizados en lotes comerciales de la variedad LCP 85-384 en el noroeste argentino evidenciaron disminuciones en el rendimiento sacarino ante la presencia de SCYLV (Fig. 4.8). De los tres ensayos llevados a cabo, los ensayos de Famaillá y Ledesma presentaron alta incidencia de SCYLV (32 y 18%, respectivamente) y el ensayo de Tabacal no presentó ninguna positiva a SCYLV de las 200 muestras analizadas. La incidencia del virus en el noroeste argentino fue previamente estimada por Bertani *et al.* (2014) quienes encontraron una amplia distribución del virus en las variedades comerciales de Tucumán. No existiendo datos a la fecha de incidencia del virus en las provincias de Jujuy y Salta. La variabilidad en la presencia del virus entre provincias puede deberse a la distribución temporo-espacial del vector y de la procedencia del material vegetal utilizado (McAllister *et al.*, 2008). En adición a esto, Lehrer *et al.* (2007) comprobaron que una hoja infectada por un áfido vector, tarda 3 semanas antes de que el virus se hubiera multiplicado lo suficiente como para ser detectado por TBIA. Otro factor que podría explicar la variabilidad entre provincias, es el manejo agronómico diferencial del cultivo en cada lote comercial de LCP 85-384, donde Famaillá se caracteriza por ser un área de secano y Ledesma un área bajo riego. Existiendo la teoría de que el déficit hídrico aumenta la transmisión de virus mediante insectos vectores. Dicha teoría se fundamenta en los resultados obtenidos por Van Munster *et al.* (2017), quienes estimaron el efecto del déficit hídrico en la transmisión de *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) y *Turnip mosaic virus* (TuMV), mediante el vector *Myzus persicae* en nabo (*Brassica rapa* cv. 'Just Right'); obteniendo como resultado un dramático incremento en la transmisión de virus en las plantas infectadas sometidas a déficit hídrico (34 y 100% en CaMV y TuMV, respectivamente) con respecto a las plantas infectadas pero sin estrés hídrico. Otros estudios indican que la baja concentración viral en las plantas podría enmascarar falsos negativos al utilizar la técnica de TBIA para su detección, debido a su baja sensibilidad (Zhu *et al.*, 2010).

La distribución espacial de las muestras positivas a SCYLV dentro de cada lote comercial evaluado (Fig. 4.6), podría atribuirse al comportamiento de los pulgones vectores, los cuales comienzan a infectar los lotes de caña de azúcar con

poblaciones de individuos alados que colonizan plantas individuales; cuando las condiciones ambientales se tornan favorables, los pulgones se despojan de sus alas y comienzan a moverse entre plantas a partir de la superposición de su follaje (esta superposición comienza aproximadamente a partir de la semana 12 después de la plantación); este comportamiento se observa principalmente entre plantas del mismo surco en comparación a plantas ubicadas entre surcos (Vaillant *et al.*, 2011).

Las muestras colectadas a campo que dieron positivas a SCYLV mediante la técnica serológica de TBIA mostraron contenidos menores de sólidos solubles (°Brix), sacarosa (pol % jugo), pureza y rendimiento sacarino que aquellas que dieron negativas a la prueba de TBIA, tanto en el ensayo llevado a cabo en Famaillá como en el de Ledesma. Estas disminuciones manifiestan el efecto en el rendimiento sacarino a causa de SCYLV y sin bien estudios previos reflejan resultados similares (Vega *et al.*, 1997; Grisham *et al.*, 2001; Rassaby *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2010), los publicados en esta tesis son los primeros resultados que se obtienen en Argentina sobre la temática. En Famaillá, los menores contenidos detectados en las muestras SCYLV+ en comparación con las muestras que dieron negativas para el virus, fueron estadísticamente significativos ($P < 0,05$) (Tabla 4.3). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en las disminuciones detectadas en Ledesma a causa de la presencia del virus ($P > 0,05$) (Tabla 4.3).

Al estimar el impacto económico en la producción de azúcar a causa de la presencia de la enfermedad en cañaverales situados en EEA INTA-Famaillá e ingenio Ledesma, se observan resultados contrastantes, con mermas de 0,17 y 1,20 t azúcar/ha, respectivamente (Tab. 4.4). Dichas mermas implicarían pérdidas aproximadamente de 1.514 \$/ha en Famaillá y 10.804 \$/ha en Ledesma. Si bien no se encontraron diferencias significativas de los valores de rendimiento sacarino (%) entre SCYLV + y - en Ledesma (Fig. 4.8), los resultados antes expuestos de mermas de producción de azúcar y su consecuente pérdida económica, revierten la importancia de la enfermedad bajo las condiciones de realización de dicho ensayo.

Conclusiones del capítulo

- *Sugarcane yellow leaf virus* causa disminuciones en el rendimiento sacarino de la variedad LCP 85-384 en lotes comerciales situados en EEA-INTA Famaillá e Ingenio Ledesma.
- La merma del rendimiento sacarino en Famaillá fue estadísticamente significativa mientras que en Ledesma no.
- El impacto económico a causa de las mermas en las toneladas de azúcar por hectárea mostró un alto impacto en Ledesma mientras que en Famaillá fue mucho menor.
- Para dimensionar el impacto de la enfermedad del amarillamiento en cañaverales del noroeste argentino es necesario contar no solo con los valores de mermas en el rendimiento sacarino sino también con las mermas en la producción de caña por hectárea.

CAPÍTULO V: CONSIDERACIONES FINALES

El cultivo de caña de azúcar en Argentina es fuente de materia prima en industrias locales y emplea gran cantidad de mano de obra, promoviendo el desarrollo territorial y el agregado de valor en origen. Dada la importancia de la caña de azúcar en el noroeste argentino y con la particularidad de ser un cultivo de propagación agámica, la prevención y control de enfermedades se torna fundamental en el manejo integrado del cultivo para evitar pérdidas económicas en la producción e industria azucarera argentina. En el caso particular de las enfermedades virales, no hay métodos curativos que puedan aplicarse para recuperar las plantas y solo el control preventivo es eficiente para evitar las epidemias, siendo de especial interés el mejoramiento genético para la resistencia de virus.

El presente trabajo de tesis, se desarrolló bajo la hipótesis de que *Sugarcane yellow leaf virus* estaba ampliamente distribuido en el noroeste argentino, con diversos genotipos virales presentes y que la enfermedad afectaba el rendimiento sacarino a nivel de industria. Los resultados y conclusiones arribadas en cada capítulo conllevan a aceptar dicha hipótesis. Detectando incidencias de SCYLV del 12 al 45% con prevalencias del 46 al 83% entre las provincias muestreadas del NOA, encontrando cierta susceptibilidad al virus en algunas variedades mientras que otras se comportaron como resistentes. Para lograr un sustancial aporte al sector cañero, se ponderaron las incidencias en función de la superficie que cada variedad ocupaba en las provincias muestreadas encontrando incidencias más bajas. Pero pese a estas disminuciones, los genotipos virales más agresivos fueron detectados en dichas regiones y los ensayos de rendimiento mostraron una disminución en el contenido de sacarosa impactando negativamente en las toneladas de azúcar producidas por hectárea. Estos resultados en sumatoria a que no hubo asociación estadísticamente significativa entre la expresión de síntomas visuales y la presencia de SCYLV, nos llevan a concluir que el amarillamiento es una enfermedad que afecta al cultivo de caña de azúcar y que la incorporación de las prácticas de detección y diagnóstico del virus como rutina en los planes de mejoramiento de caña de azúcar es de fundamental importancia a la hora de desarrollar nuevas variedades comerciales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Abu Ahmad, Y., Girard, J.-C., Fernandez, E., Pauquet, J., Lockhart, B.E.L., Letourmy, P., P. Rott. (2007b). Variation in virus populations and growth characteristics of two sugarcane cultivars naturally infected by *Sugarcane yellow leaf virus* in different geographical locations. *Plant Pathology*, 56, 743-754.
- Abu Ahmad, Y., Rassaby, L., Royer, M., Borg, Z., Braithwaite, K.S., Mirkov, T.E., Irej, M.S., Perrier, X., Smith, G.R., Rott, P. (2006a). Yellow leaf of sugarcane is caused by at least three different genotypes of sugarcane yellow leaf virus, one of which predominates on the Island of Réunion. *Archives of Virology*, 151(7), 1355-1371.
- Abu Ahmad, Y., Royer, M., Daugrois, J.-H., Costet, L., Lett, J.-M., Victoria, J.I., Girard, J.-C., Rott, P. (2006b). Geographical Distribution of Four *Sugarcane yellow leaf virus* Genotypes. *Plant Disease*, 90(9), 1156-1160.
- Aday Díaz, O.C., O-Hechavarría, M.L.L Zardón Navarro, M. A., Rodríguez Lema, E., Estrada Martínez, M.E., Mesa López, J.M., Zayas Barrera, C.M., Ruffin Hernández, Y., Díaz Mujica, F. R. (2014b). Incidencia del *Virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar* en la colección de germoplasma en Cuba. *Fitosanidad* 18(1), 15-21.
- Aday Diaz, O.C., O-Hechavarría, M.L.L, Zardón Navarro, M. A, Rodríguez Lema, E., Mesa López, J.M., Puchades Izaguirre, Y., Díaz Mujica, F.R. (2014c). Genealogía de cultivares de caña de azúcar resistentes y susceptibles a la hoja amarilla. *Centro Agrícola*, 41(1): 47-52.
- Aday Díaz, O.C., O-Hechavarría, M.L.L, Zardón Navarro, M. A., Rodríguez Lema, E., Mesa López, J.M., Puchades Izaguirre, Y., Delgado Padrón, J., Díaz Mujica, F.R. (2014a). Distribución del *Virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar* en Cuba. *Rev. Protección Vegetal*, 29 (3), 177-184.
- Amata, R.L., Fernandez, E., Filloux, D., Martin, D.P., Rott, P., Roumagnac, P. (2016). Prevalence of *Sugarcane yellow leaf virus* in sugarcane-producing regions in Kenya revealed by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification method. *Plant Disease*, 100(2), 260-268.
- Anino P, Pizzo F. (2016). Informes de cadenas de valor. Subsecretaría de planificación económica dirección nacional de planificación regional - dirección nacional de planificación sectorial, 1(3), 1-37.
- Benedetti, P.E., Morales, C.C. (18 de mayo de 2018). *Tucumán cuenta con 273.737 ha cultivadas con caña de azúcar*. Recuperado el 26 de julio de 2018 en: <https://inta.gob.ar/noticias/tucuman-cuenta-con-273737-ha-cultivadas-con-cana-de-azucar>

- Bertani, R.P., Perera, M.F., Arias, M.E., Luque, C., Funes, C., González, V., Cuenya, M.I., Ploper, L.D., Welin, B., Castagnaro, A.P. (2014). A Study of the Sugarcane Yellow Leaf Disease in Argentina. *Plant Disease*, 98(8), 1036-1042.
- Bolívar, A.G., Castillo, R.O., Mendoza, M.J., Garcés, O.F. (2015). Factores que afectan la calidad de la caña de azúcar. Carta Informativa Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador – CINCAE. 1-8.
- Cafrune, E.E., Pérez Gómez, S., Conci, V.C., Rago, A. (2012). Identificación de *Sugarcane yellow leaf virus* afectando caña de azúcar en Argentina. XVIII Reunión Técnica Nacional de la Caña de Azúcar. 11 al 13 de abril de 2012, Tucumán, Argentina. Organizada por la Sociedad Argentina de Técnicos de la Caña de Azúcar (SATCA). Págs. 69-73.
- Castaño Zapata, J. (2002). Principios básicos de fitoepidemiología. Universidad de Caldas. ISBN 958804149X, 9789588041490. Pp 398.
- Centro Azucarero Argentino (CAA). *Argentina: Zafra azucarera 2016*. Recuperado el 14 de agosto de 2018 en: <http://centrozucarero.com.ar/oldsite/zafras/zafra2016.html>
- Cerutti, J. (2016). Análisis tecnológicos y prospectivos sectoriales. Papel y celulosa. Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva.
- Chinnaraja, C., Viswanathan, R. (2015). Quantification of *Sugarcane yellow leaf virus* in sugarcane following transmission through aphid vector, *Melanaphis sacchari*. *Virus Disease*, 26(4):237-242.
- Comstock, J., Irvine, J., Miller, J. (1994). Yellow leaf syndrome appears on the United States mainland. *International Sugar Journal*, 56, 33-35.
- Comstock, J.C., Miller J.D., Schnell, R.J. (2001). Incidence of *Sugarcane yellow leaf virus* in clones maintained in the world collection of sugarcane related Grasses at the United States National Repository in Miami, Florida. *Sugar Tech*, 3 (4), 128-133.
- Comstock, J.C., Miller, J.D., Schnell, R.J., Ayala-Silva, T. (2005). *Sugarcane yellow leaf virus* in the world collection of sugarcane and related grasses at Miami, Florida. *Proc. ISSCT*, 25,691-694.
- 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. *Proc Int Soc Sugarcane Technol Cong*, 23, 366-372.
- Cronje, C.P.R., Tymon, A.M., Jones, P., Bailey, R.A. (1998). Association of a phytoplasma with a yellow leaf syndrome of sugarcane in Africa. *Annals of applied biology*, 133,177-186.
- D’Arcy C.J., Domier L.L., in *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, ed. By Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. (Elsevier Academic Press, New York, 2005).
- Di Rienzo, J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. (2017). InfoStat (Versión 2017). , FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

- Di Sciullo, J.C., Nalpatian, R.D., González, J.M., Ayala, J.M., Lujan Sobrino, B. (2017). Informe de Coyuntura Mensual CADENA AZÚCAR. Subsecretaria de alimentos y bebidas, Secretaria de agregado de valor, 83.
- Digonzelli, P., Romero, E., Scandaliaris, J. (2015). La caña de azúcar y su ambiente. En: Guía técnica del cañero. Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres. pp. 13-19. ISBN 978-987-26238-1-4.
- Doyle, J., Doyle, J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.
- ElSayed, A.I., Weig, A.R., Komor, E. (2011). Molecular characterization of Hawaiian *Sugarcane yellow leaf virus* genotypes and their phylogenetic relationship to strains from other sugarcane-growing countries. *European Journal of Plant Pathology*, 129(3), 399-412.
- Esri, R. (2010). ArcGIS desktop: release 10. Environmental Systems Research Institute, CA.
- Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC). *LCP 85-384 Comienza a decrecer su superficie cultivada en el área cañera de Tucumán*. Recuperado el 14 de agosto de 2018 en: <http://www.eeaoc.org.ar/upload/contenido/pdf/20170819063335000000.pdf>
- Estación Experimental Agropecuaria Famaillá. *Variedad: LCP 85-384*. Recuperado el 14 de agosto de 2018 en: <https://inta.gob.ar/variedades/lcp-85-384>
- Francki, R.I.B., Milne, R.G., Hatta, T. (1985). Luteovirus group. In: Atlas of plant viruses, 1, 137-152.
- Gonçalves, M.C., Klerks, M.M., Verbeek, M., Vega, J., van den Heuvel, J.F.J.M. (2002). The use of molecular beacons combined with NASBA for the sensitive detection of *Sugarcane yellow leaf virus*. *European Journal of Plant Pathology*, 108(5), 401-407.
- Grisham, M.P., Eggleston, G., Hoy J.W., Viator, R.P. (2009). The effect of Sugarcane yellow leaf virus infection on yield of sugarcane in Louisiana. *Sugar cane international*, 27 (3), 91-94.
- Grisham, M.P., Pan, Y-B., Legendre, B.L., Godshall, M.A., Eggleston, G. (2001). Effect of *Sugarcane yellow leaf virus* on sugarcane yield and juice quality. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.*, 24, 434-438.
- International Sugar Organization (ISO). *New Information from the Institute of Food Science and Technology provides technical analysis on dietary sugars*. Recuperado el 14 de agosto de 2018 en: <https://www.isosugar.org/sugarsector/sugar>
- Izaguirre-Mayoral, M, Carballo, O., Alceste, C., Romano, M., Nass, H. (2002). Physiological performance of asymptomatic and yellow leaf syndrome-affected sugarcane in Venezuela. *Journal of Phytopathology* 150(1), 13–19.
- Khoodoo, M.H.R., Behary-Paray, N., Ganeshan, S., Saumtally, A.S. (2010). Distribution of *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) in commercial cultivars in Mauritius and its potential impact on yield. *Proc. int. soc. sugar cane technol.*, 27, 1-9.

- King, A.M.Q.; Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (2012). Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, pp. 835-899.
- Komor, E., ElSayed, A., Lehrer, A.T. (2010). *Sugarcane yellow leaf virus* introduction and spread in Hawaiian sugarcane industry: Retrospective epidemiological study of an unnoticed, mostly asymptomatic plant disease. *European Journal of Plant Pathology*, 127(2), 207-217.
- Lalonde, S., Tegeder, M., Throne-Holst, M., Frommer, W.B., Patrick, J.W. (2003) Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant Cell Environment*, 26, 37-56.
- Larrahondo, J.E. (1995). Calidad de la caña de azúcar. En: CENICAÑA. El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia, Cali, CENICAÑA. P.337-354.
- Lehrer, A., Meinzer, R., Moore, P., Komor, E. (2001). Physiological consequences of *Sugarcane yellow leaf virus* infection on the sugarcane plant. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.*, 24, 657-659.
- Lehrer, A.T., Komor, E. (2008). Symptom expression of yellow leaf disease in sugarcane cultivars with different degrees of infection by *Sugarcane yellow leaf virus*. *Plant Pathology*, 57, 178-189.
- Lehrer, A.T., Kusalwong, A., Komor, E. (2008). High incidence of *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) in sugar plantations and germplasm collections in Thailand. *Australasian Plant Disease Notes*, 3, 89-92.
- Lehrer, A.T., Schenck, S., Yan, S.-L., Komor, E. (2007). Movement of aphid-transmitted *Sugarcane yellow leaf virus* (ScYLV) within and between sugarcane plants. *Plant Pathology* 56, 711-717.
- Lin, Y.-H., Gao, S.-J., Damaj, M.B., Fu, H.-Y., Chen, R.-K., Mirkov, T.E. (2014). Genome characterization of *Sugarcane yellow leaf virus* from China reveals a novel recombinant genotype. *Archives of Virology*, 159(6), 1421-1429.
- Lockhart, B.E.L., Irely, M.J., Comstock, J.C. (1996). Sugarcane bacilliform virus, sugarcane mild mosaic virus and sugarcane yellow leaf syndrome. Pages 108-112 in: Sugarcane Germplasm Conservation and Exchange. B. J. Croft, C. M. Piggins, E. S. Wallis, and D. M. Hogarth, eds. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra.
- López, M., Hidalgo, W., Simosa, N., Briceño, R., Párraga, C. (2004). Incidencia del virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar y del Síndrome del amarillamiento foliar en la región centroccidental de Venezuela. *Fitopatología Venezolana*, 17 (2), 43-48.
- Maia, I.G., Gonçalves, M.C.; Arruda, P., Vega, J. (2000). Molecular evidence that *sugarcane yellow leaf virus* (ScYLV) is a member of the Luteoviridae family. *Archives of Virology*, 145: 1009–1019.
- Malizia, S., García Moritán, M., Brown, A.D. (2014). Bitácora La ruta del azúcar. 200 años promoviendo el desarrollo regional. *Ediciones del Subtrópico*.

- McAllister, C.D., Hoy, J.W., Reagan, T.E. (2008). Temporal increase and spatial distribution of Sugarcane yellow leaf and infestations of the aphid vector, *Melanaphis sacchari*. *Plant Disease*, 92 (4), 607-615.
- Moonan, F., Mirkov, T.E. (2002). Analyses of genotypic diversity among North, South, and Central American isolates of *Sugarcane yellow leaf virus*: evidence for Colombian origins and for intraspecific spatial phylogenetic variation. *Journal of Virology*, 76(3), 1339-1348.
- Moonan, F., Molina, J., Mirkov, T.E. (2000). *Sugarcane Yellow Leaf Virus*: An Emerging Virus That Has Evolved by Recombination between Luteoviral and Poleroviral Ancestors. *Virology* 269, 156-171.
- Moutia, J.F.Y., Saumtally, S. (1999). Symptomology of Yellow leaf syndrome and detection and distribution of *Sugarcane yellow leaf virus* in Mauritius. *Proceedings of International Society of Sugar Cane Technologists*, 24, 451-455.
- Rago A. (2010). Nuevos desafíos de la fitopatología en caña de azúcar. XVI Reunión Técnica Nacional de la caña de azúcar. Sociedad Argentina de Técnicos de la caña de azúcar. Tucumán. Resumen 25.
- Ramallo. C.J., Ploper. L.D. (1998). ¿Síntomas de amarillamiento en cañaverales de Tucumán?, *Avance Agroindustrial* 18(72), 16-18.
- Rao, G.P., Gaur, R.K., Singh, M., Viswanathan, R., Chandrasena, G., Dharamwardhane, N.M.W.N. (2001). Occurrence of *Sugarcane yellow leaf virus* in India and Sri Lanka. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.*, 24, 469-470.
- Rassaby L, Girard J.C., Irely M.S., Lockhart B.E.L., Rott P. (1999). Survey of sugarcane yellow leaf syndrome in Réunion Island. *Sugar Cane*, 5, 16-18.
- Rassaby, L., Girard, J.-C., Lemaire, O., Costet, L., Irely, M.S., Kodja, H., Lockhart, B.E.L., Rott, P. (2004). Spread of *Sugarcane yellow leaf virus* in sugarcane plants and fields on the island of Réunion. *Plant Pathology*, 53, 117-125.
- Rassaby, L., Girard, J.-C., Letourmy, P., Chaume, J., Irely, M. S., Lockhart, B.E.L., Kodja, H., Rott, P. (2003). Impact of *Sugarcane yellow leaf virus* on Sugarcane Yield and Juice Quality in Réunion Island. *European Journal of Plant Pathology*, 109(5), 459-466.
- Rezende, J.A.M., Kitajima, E.W. (2011) Vírus e Viróides. En Amorim, L., Rezende, J.A.M., Bergamin Filho, A. *Manual de Fitopatología, Volume I: Princípios e Conceitos* (Quarta edição). Editora Agronomica Ceres Ltda São Paulo - SP.
- Ríos, F., Delgado Cordero, M. (2008). Cadena de valor de la caña de azúcar. En Economía de los cultivos industriales: algodón, caña de azúcar, maní, tabaco, té y yerba mate. Ediciones Instituto Nacional de Tecnologías Agropecuarias. pp. 25-31. ISBN 978-987-521-336 - 4
- Romero E.R., Digonzelli P.A., Scandaliaris J. (2009). Capítulo 1-La caña de azúcar, características y ecofisiología. En Manual del cañero. (p. 13). 1a ed.-Las Talitas: Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes.

- Rott, P., Bailey, R.A., Comstock, J.C., Croft, B.J., Sauntally, A.S. (2000). A Guide to Sugarcane Diseases. Editions Quae.
- Scagliusi, S.M., Lockhart, B.E.L. (2000). Transmission, Characterization, and Serology of a Luteovirus Associated with Yellow Leaf Syndrome of Sugarcane. *Phytopathology*, 90(2), 120-124.
- Schenck S. (1997a). advances control yellow leaf syndrome. Pathology report 67. Hawaii Agriculture Research Center. 4p.
- Schenck, S., Hu, J.S., Lockhart, B.E.L (1997b). Use of a tissue blot immunoassay to determine the distribution of sugarcane yellow leaf virus in Hawaii. Sugar Cane (United Kingdom).
- Schenck, S., Lehrer, A.T. (2000). Factors Affecting the Transmission and Spread of *Sugarcane yellow leaf virus*. *Plant Disease*, 84(10), 1085-1088.
- Singh, D., Rao, G.P., Snehi, S.K., Raj, S.K., Karuppaiah, R., Viswanathan, R. (2011). Molecular detection and identification of thirteen isolates of *Sugarcane yellow leaf virus* associated with Sugarcane yellow leaf disease in nine sugarcane growing states of India. *Australasian Plant Pathology*, DOI 10.1007/s13313-011-0061-y.
- Smith, G.R., Borg, Z., Lockhart, B.E.L., Braithwaite, K.S., Gibbs, M.J. (2000). *Sugarcane yellow leaf virus*: a novel member of the *Luteoviridae* that probably arose by inter-species recombination. *Journal of General Virology*, 81(7), 1865-1869.
- Vaillant, J., Puggioni, G., Waller, L.A., Daugrois, J. (2011). A spatio-temporal analysis of the spread of sugarcane yellow leaf virus. *Journal of Time Series Analysis*, 32, 396-406.
- Van Munster, M., Yvon, M., Vile, D., Dader, B., Fereres, A., Blanc, S. (2017). Water deficit enhances the transmission of plant viruses by insect vectors. PLOS ONE 12(5): e0174398. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174398>.
- Vasconcelos, A.C.M., Gonçalves, M.C., Pinto, L.R., Landell, M.G.A., Perecin, D. (2007). Effects of *Sugarcane yellow leaf virus* infection on sugarcane yield and root system development. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.*, 26, 1052-1056.
- Vega, J., Scagliusi, S.M.M., Ulian, E.C. (1997). Sugarcane Yellow Leaf Disease in Brazil: Evidence of Association with a Luteovirus. *Plant Disease*, 81(1), 21-26.
- Verheye, W.H. (2010). Growth and production of sugarcane. In: Soils, plant growth and crop production, Volume II. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)
- Victoria Kafure, J.I., Garcés Obando, F.F., Guzmán Romero, M.L., Ángel, F. (1998). Síndrome de la hoja amarilla en Colombia ScYLV (*Sugarcane Yellow Leaf Virus*). CENICAÑA, Carta Trimestral 2 y 3.
- Victoria, J.I., Guzmán, M.L., Cuervo, E., Lockhart, B. (1999) Síndrome de la hoja amarilla en Colombia. CENICAÑA, Serie divulgativa N° 07.
- Viswanathan, R., Balamuralikrishnan, M., Karuppaiah, R. (2008). Identification of three genotypes of *Sugarcane yellow leaf virus* causing yellow leaf disease from India and their molecular characterization. *Virus Genes*, 37, 368–379.

- Wang M.Q., Xu D.L., Li R., Zhou G.H. (2012). Genotype identification and genetic diversity of *Sugarcane yellow leaf virus* in China. *Plant Pathology*, 61, 986–993.
- Wang, M.-Q., Zhou, G.-H. (2010). A near-complete genome sequence of a distinct isolate of *Sugarcane yellow leaf virus* from China, representing a sixth new genotype. *Virus Genes*, 41(2), 268-272.
- Xie, Y., Wang, M., Xu, D., Li, R., Zhou, G. (2009). Simultaneous detection and identification of four sugarcane viruses by one-step RT-PCR. *Journal of virological methods*, 162, 64-8.
- Zhou, G.H., Li J.G., Xu D.L., Shen W.K., Deng H.H. (2006). Occurrence of *Sugarcane yellow leaf virus* in South China and its transmission by the sugarcane-colonizing aphid, *Ceratovacuna lanigera*. *Scientia Agricultura Sinica*, 39(10), 2023-2027.
- Zhu, Y. J., Lim, S.T.S., Schenck, S., Arcinas, A., Komor, E. (2010). RT-PCR and quantitative real-time RT-PCR detection of Sugarcane yellow leaf virus (SCYLV) in symptomatic and asymptomatic plants of Hawaiian sugarcane cultivars and the correlation of SCYLV titre to yield. *European Journal of Plant Pathology*, 127(2), 263-273.

Extracción de ácidos nucleicos totales CTAB modificado

1. Moler 0,05 gr de hoja en nitrógeno líquido
2. Agregar 500µl de buffer CTAB 2% + 2% de β-mercapto
3. Incubar 20 min a 60°C
4. Agregar 500µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1)
5. Centrifugar 5 min a 10.000 rpm a temperatura ambiente
6. Poner el sobrenadante en un nuevo tubo
7. Agregar 500µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1)
8. Centrifugar 5 min a 10.000 rpm a temperatura ambiente
9. Poner el sobrenadante en un nuevo tubo
10. Agregar 1/10 volúmenes de AcNa pH 5,2 y agitar
11. Agregar 2,5 volúmenes de Etanol Absoluto
12. Mezclar por inversión
13. Incubar 40 minutos a -70°C
14. Centrifugar 30 min a 12.000 rpm
15. Descartar el líquido y quedarse con el pellet
16. Agregar 1 ml de etanol 70% al pellet
17. Centrifugar 10 min a 12.000 rpm
18. Secar el pellet
19. Resuspender en 40µl de agua DEPC

RT-PCR

Componentes y volúmenes de la mezcla:

| MIX | 1X (μl) |
|--------------------------|-----------|
| Buffer AMV/Tfl 5x | 5 |
| Mg SO4 25mM | 2 |
| dNTPs 10mM | 0,6 |
| Cebador Forward 100 μM * | 0,6 |
| Cebador Reverse 100 μM * | 0,6 |
| Enzima AMV | 0,6 |
| Enzima TFl | 0,6 |
| Agua DEPC | 14 |
| ARN eluido | 1 |
| Volumen final | 25 |

Condiciones de ciclado:

| Temperatura (°C) | Tiempo (min) | |
|---------------------|-----------------|-------------|
| 48 | 60 | |
| 94 | 2 | |
| 94 | 0,25 | } 35 ciclos |
| 61 | 2 | |
| 68 | 2 | |
| 68 | 10 | |

Tissue Blot immunoassay

Listado de tampones:

Tampón TBS

| | 1X |
|------|--------|
| Tris | 0,02M |
| NaCl | 0,15 M |

Tampón Bloqueo

| | 1X |
|---------------------------|----|
| TBS | 1X |
| Leche en polvo descremada | 5% |
| Tritón X-100 | 2% |

Tampón Lavado

| | 1X |
|----------|-------|
| TBS | 1X |
| Tween 20 | 0,05% |

Tampón Antisuero

| | 1X |
|---------------------------|----|
| TBS | 1X |
| Leche en polvo descremada | 2% |

Tampón Sustrato pH 9,5

| | 1X |
|--------------------------------------|-------|
| Trisma base | 0,1M |
| NaCl | 0,1 M |
| Cl ₂ Mg 6H ₂ O | 5 mM |

Preparación de la muestra:

1. Cortar transversalmente la parte basal de la hoja y luego longitudinalmente a ambos lados de la nervadura principal
2. Imprimir las muestras en membrana de nitrocelulosa.

Desarrollo serológico de la prueba

Todo el proceso se realiza a temperatura ambiente

1. Bloquear las membranas con tampón bloqueo durante toda la noche y en agitación
2. Enjuagar las membranas con tampón TBS en agitación, durante 5 min (repetir 3 veces)
3. Diluir el antisuero SCYLV en tampón antisuero (1/2.000) e incubar las membranas 2 horas en agitación
4. Lavar las membranas durante 5 min con tampón lavado en agitación (repetir 3 veces)
5. Incubar las membranas durante una hora con el antisuero secundario (inmunoglobulina anti-Ig, obtenida en cabra y conjugada con enzima fosfatasa alcalina, BIO-RAD) diluido 1/3.000 en tampón antisuero
6. Lavar las membranas durante 5 min con tampón lavado en agitación (repetir 3 veces)
7. Revelar las membranas con tampón sustrato pH 9,5 y NBT+BCIP (cada 5 ml de tampón sustrato, 33 µl NBT y 16.5 µl BCIP).
8. Detener la reacción con agua, secar las membranas a temperatura ambiente y almacenar en papel.

2015. Asinari F.; Pérez Gómez S.; Rago A.M.; Cafrune E.E. “Estudios epidemiológicos de *Sugarcane yellow leaf virus* en el Noroeste Argentino”. En las XV Jornadas Fitosanitarias Argentinas, bajo el lema: “Desafíos fitosanitarios actuales y futuros”. Provincia de Santa Fe. 7 al 9 de Octubre de 2015. Páginas 28. ISSN 2451- 8069.

2016. Asinari F.; Pérez Gómez S.; Rago A.M.; Cafrune E.E. “Virus del amarillamiento en la caña de azúcar: incidencia y prevalencia en las principales provincias productoras”. En XX Reunión Técnica Nacional de la Caña de Azúcar de la Sociedad Argentina de Técnicos de la Caña de Azúcar (SATCA); 8 y 9 de abril del 2016, Tucumán, Argentina.

2017. Asinari F., Pérez Gómez S.G.; Rago A.M.; Cafrune E.E. “Prospección del *Sugarcane yellow leaf virus* en el noroeste argentino”. En 4º Congreso Argentino de Fitopatología, bajo el lema: “Trabajar en equipo organiza el trabajo y multiplica los resultados”. Provincia de Mendoza. 19, 20 y 21 de abril de 2017. Páginas 259. ISBN 978-987-24373-2-9.

2017. Asinari F., Pérez Gómez S.G.; Rago A.M.; Cafrune E.E. “Evaluación de genotipos del *Sugarcane yellow leaf virus* presentes en variedades comerciales de caña de azúcar”. En 4º Congreso Argentino de Fitopatología, bajo el lema: “Trabajar en equipo organiza el trabajo y multiplica los resultados”. Provincia de Mendoza. 19, 20 y 21 de abril de 2017. Páginas 260. ISBN 978-987-24373-2-9.